

Recd PCT 18 APR 2003

10/531572

PCT/JP 03/13530

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

23.10.03

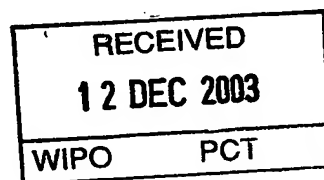
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年10月16日

出願番号
Application Number: 特願2003-356749
[ST. 10/C]: [JP 2003-356749]

出願人
Applicant(s): キヤノン株式会社

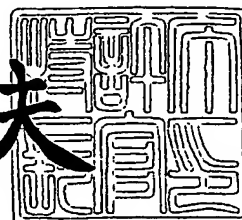


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月28日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 257100
【提出日】 平成15年10月16日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C08G 63/06
C12P 7/62

【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
【氏名】 見目 敬

【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
【氏名】 古崎 眞也

【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
【氏名】 本間 務

【発明者】
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
【氏名】 矢野 哲哉

【特許出願人】
【識別番号】 000001007
【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】
【識別番号】 100123788
【弁理士】
【氏名又は名称】 宮崎 昭夫
【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】
【識別番号】 100088328
【弁理士】
【氏名又は名称】 金田 暢之

【選任した代理人】
【識別番号】 100106297
【弁理士】
【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】
【識別番号】 100106138
【弁理士】
【氏名又は名称】 石橋 政幸

【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2002-309786
【出願日】 平成14年10月24日

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 201087
【納付金額】 21,000円

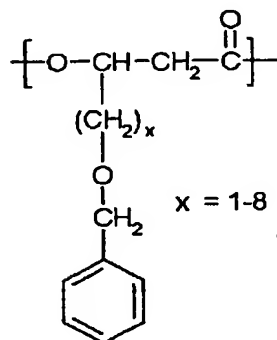
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0305903

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

化学式 (1) に示す 3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸ユニットを含むことを特徴とするポリヒドロキシアルカノエート。

【化 1】



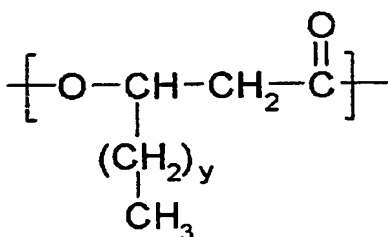
(1)

(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

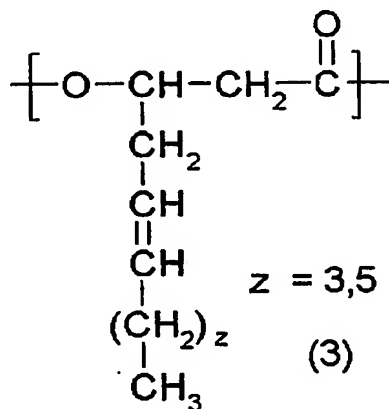
【請求項 2】

前記化学式 (1) に示すユニット以外に、化学式 (2) 及び (3) に示すユニットの少なくとも一つを含む、請求項 1 記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【化 2】

 $y = 1-8$

(2)

 $z = 3,5$

(3)

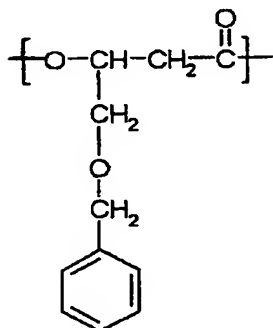
(y 及び z は化学式 (1) で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。)

【請求項 3】

前記化学式 (1) に示す 3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸ユニットが、

化学式 (6) :

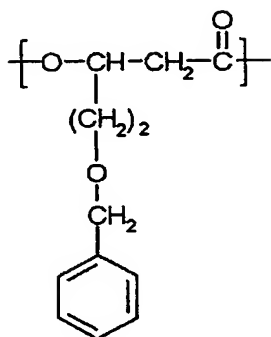
【化 3】



(6)

に示す 3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸ユニット、及び
化学式(7) :

【化4】



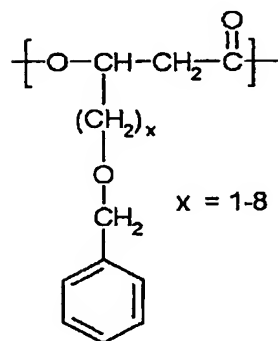
(7)

に示す 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニット、
のうちのいずれか一つ以上である、請求項1又は2に記載のポリヒドロキシアリカノエー
ト。

【請求項4】

前記化学式(1) :

【化5】



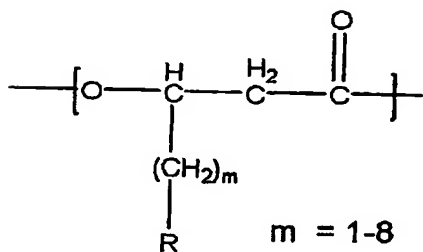
$x = 1-8$

(1)

(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

に示す 3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットと、
化学式(4) :

【化6】



$m = 1-8$

(4)

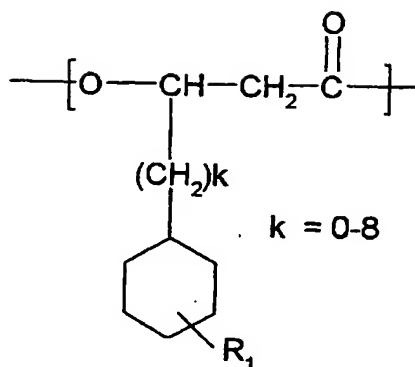
(m は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る；Rはフェニル構造
或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

で示すユニット、

もしくは

化学式(5) :

【化7】



(式中、 R_1 はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_1 はH原子、CN基、 NO_2 基、ハロゲン原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、 k は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

に示す3-ヒドロキシ- ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニットと

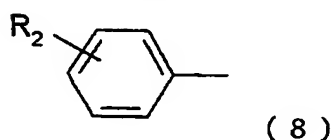
を少なくとも分子中に同時に含む、請求項1乃至3のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【請求項5】

前記化学式(4)におけるR、即ちフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基が、

化学式(8)：

【化8】

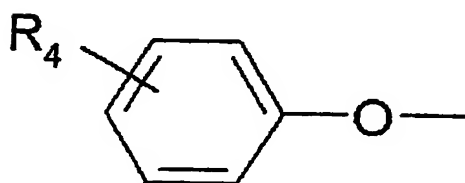


(式中、 R_2 は芳香環への置換基を示し、 R_2 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $CH=CH_2$ 基、 $COOR_3$ (R_3 : H原子、Na原子、K原子のいずれかを表す)、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_2 は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(9)：

【化9】

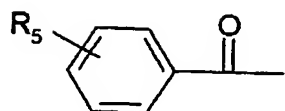


(式中、 R_4 は芳香環への置換基を示し、 R_4 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 SCH_3 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_4 は、異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(10)：

【化10】



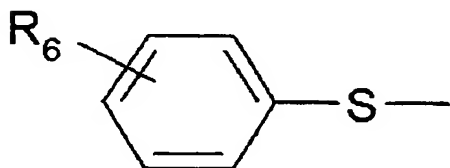
(10)

(式中、 R_5 は芳香環への置換基を示し、 R_5 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_5 は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(11):

【化11】



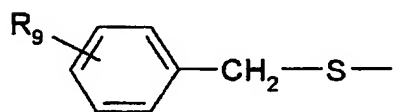
(11)

(式中、 R_6 は芳香環への置換基を示し、 R_6 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_7$ 、 SO_2R_8 (R_7 : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_8 : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_6 は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(12):

【化12】



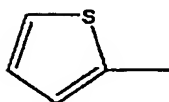
(12)

(式中、 R_9 は芳香環への置換基を示し、 R_9 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_{10}$ 、 SO_2R_{11} (R_{10} : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_{11} : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_9 は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(13):

【化13】

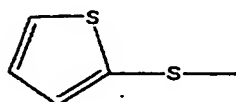


(13)

で示される残基、

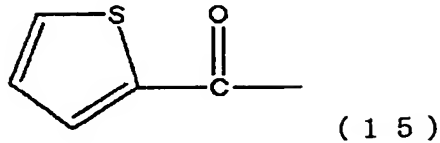
化学式(14):

【化14】

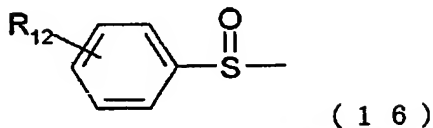


(14)

で示される残基、
化学式 (15) :
【化15】

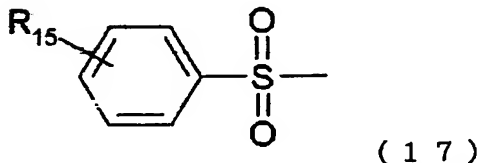


で示される残基、
化学式 (16) :
【化16】



(式中、R₁₂は芳香環への置換基を示し、R₁₂はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR₁₃、SO₂R₁₄ (R₁₃: H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R₁₄: OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、R₁₂は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、及び
化学式 (17) :
【化17】



(式中、R₁₅は芳香環への置換基を示し、R₁₅はH原子、ハロゲン原子、CN基、NO₂基、COOR₁₆、SO₂R₁₇ (R₁₆: H、Na、K、CH₃、C₂H₅のいずれかを表し、R₁₇: OH、ONa、OK、ハロゲン原子、OCH₃、OC₂H₅のいずれかを表す)、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、(CH₃)₂-CH基または(CH₃)₃-C基であり、複数のユニットが存在する場合、R₁₅は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群

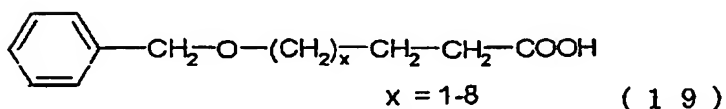
からなる群より選択される1つ以上の残基であることを特徴とする請求項4記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【請求項6】

数平均分子量が1000から1000000の範囲である請求項1乃至5のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエート。

【請求項7】

化学式 (19) :
【化18】

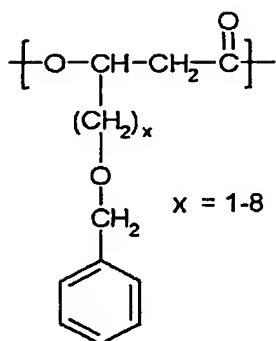


(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

で示すω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸を含む条件下で、

前記化学式(19)で示すω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸を原料として、
化学式(1) :

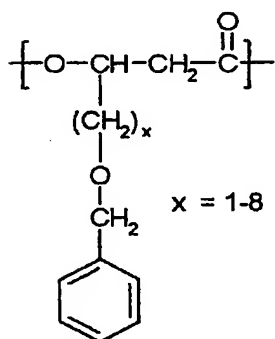
【化19】



(1)

(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値を取り得る)
 で示す3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートを生産する能力を有する微生物により生合成せしめることを特徴とする、
 前記化学式(1):

【化20】



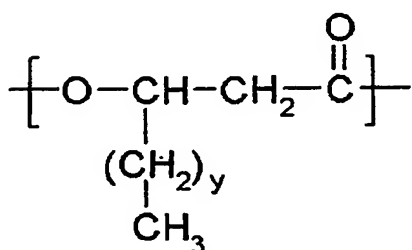
(1)

(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値を取り得る)
 で示す3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

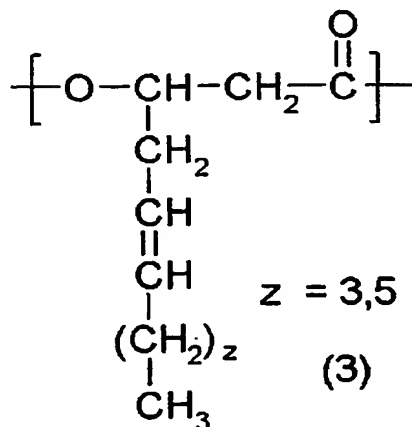
【請求項8】

前記化学式(1)で示されるユニットに加えて、下記化学式(2)及び(3)に示されるユニットの少なくとも一つを含む、請求項7記載のポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法。

【化21】

 $y = 1-8$

(2)

 $z = 3,5$

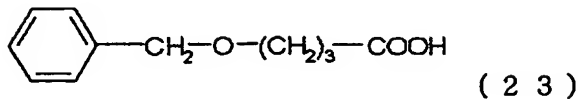
(3)

(y及びzは化学式(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値を取り得る。)

【請求項9】

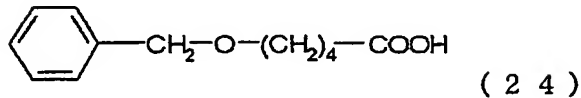
前記化学式 (19) に示す ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸が、
化学式 (23) :

【化 2 2】



に示す 4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸、及び
化学式 (24) :

【化 2 3】

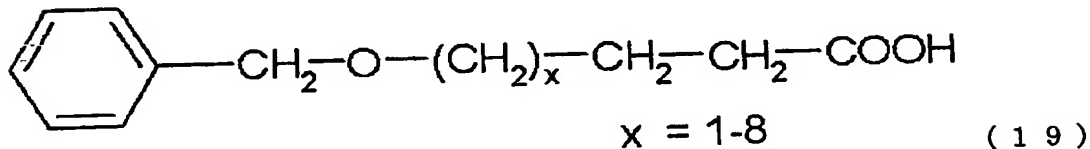


に示す 5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸
のうちのいずれか 1 つ以上である請求項 7 又は 8 に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項 10】

前記化学式 (19) :

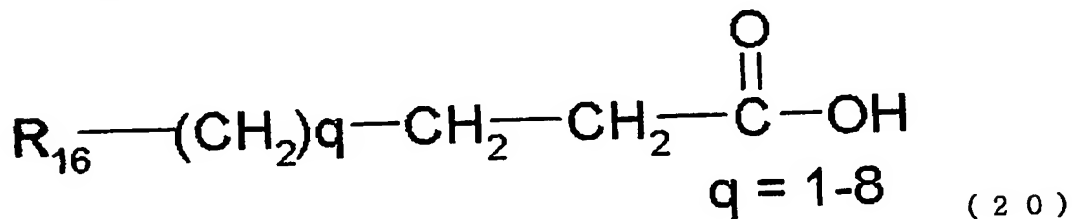
【化 2 4】



(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

で示す ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸と、
化学式 (20) :

【化 2 5】



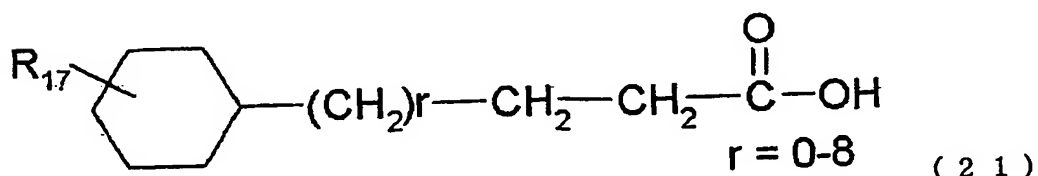
(q は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る ; R₁₆ はフェニル構造、或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

で示す化合物、

しくは

化学式 (21) :

【化 2 6】



(式中、R₁₇ はシクロヘキシル基への置換基を示し、R₁₇ は H 原子、CN 基、NO₂ 基、ハロゲン原子、CH₃ 基、C₂H₅ 基、C₃H₇ 基、CF₃ 基、C₂F₅ 基または C₃F₇ 基であり

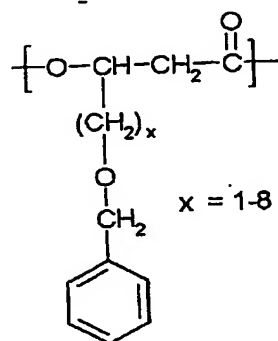
、また、 r は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸と

を含む条件下で、前記化学式 (19) で示す ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸、及び前記化学式 (20) で示す化合物もしくは前記化学式 (21) で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸を原料として、

前記化学式 (1) :

【化 27】



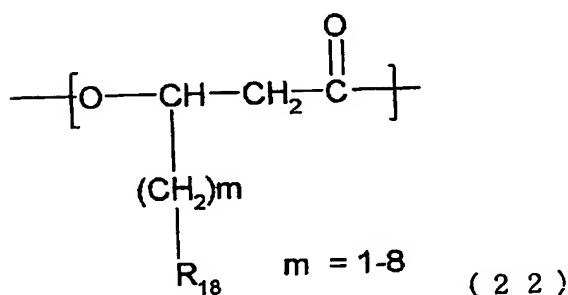
(1)

(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

で示す 3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸ユニットと、

化学式 (22) :

【化 28】



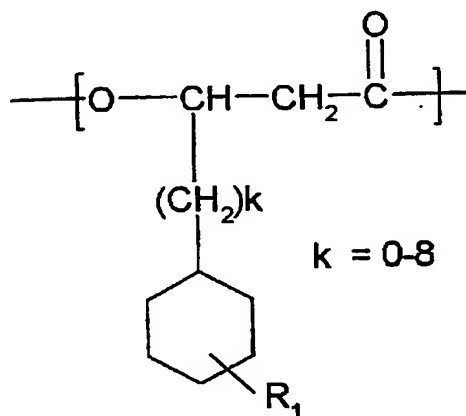
(m は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る ; R_{18} はフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

で示すユニット

もしくは

化学式 (5) :

【化 29】

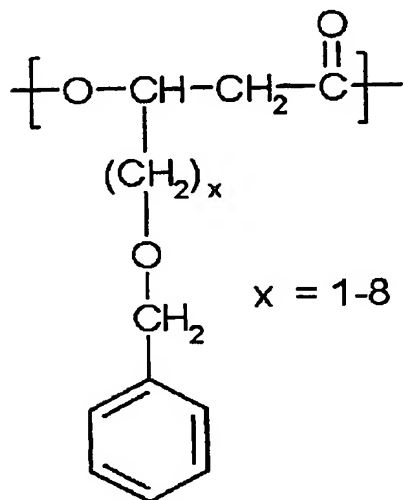


(5)

(式中、 R_1 はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_1 は H 原子、CN 基、 NO_2 基、ハロゲン原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、

また、k は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)
 に示す 3-ヒドロキシ- ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニットと
 を少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシルアルカノエートを生産する能力を有する
 微生物により生合成せしめることを特徴とする、
 前記化学式 (1) :

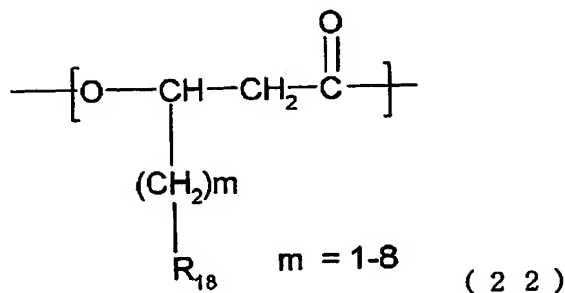
【化 30】



(1)

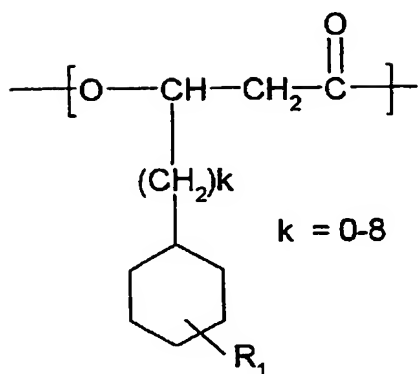
(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)
 で示す 3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸ユニットと、
 前記化学式 (22) :

【化 31】



(m は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る ; R_{18} はフェニル構造
 或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)
 で示すユニット
 もしくは
 前記化学式 (5) :

【化 3 2】



(式中、 R_1 はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_1 はH原子、CN基、 NO_2 基、ハロゲン原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、また、 k は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

に示す 3-ヒドロキシ- ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニットと、

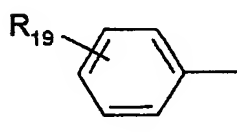
を少なくとも分子中に同時に含む、請求項 7 乃至 9 のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項 11】

前記化学式 (20) における R_{16} 及び前記化学式 (22) における R_{18} 、即ちフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基が、

化学式 (25) :

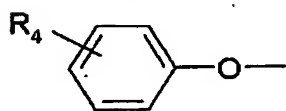
【化 3 3】



(式中、 R_{19} は芳香環への置換基を示し、 R_{19} はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $CH=CH_2$ 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_{19} は、ユニット毎に異なってもよい。)で示される残基群、

化学式 (9) :

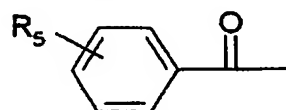
【化 3 4】



(式中、 R_4 は芳香環への置換基を示し、 R_4 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 SCH_3 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_4 は、ユニット毎に異なってもよい。)で示される残基群、

化学式 (10) :

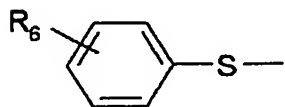
【化 3 5】



(式中、 R_5 は芳香環への置換基を示し、 R_5 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_5 は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、
化学式 (11) :

【化 36】

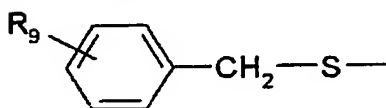


(11)

(式中、 R_6 は芳香環への置換基を示し、 R_6 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_7$ 、 SO_2R_8 (R_7 : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_8 : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_6 は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、
化学式 (12) :

【化 37】

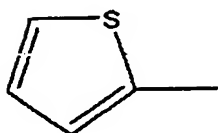


(12)

(式中、 R_9 は芳香環への置換基を示し、 R_9 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_{10}$ 、 SO_2R_{11} (R_{10} : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_{11} : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_9 は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、
化学式 (13) :

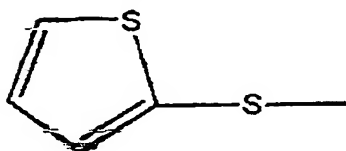
【化 38】



(13)

で示される残基、
化学式 (14) :

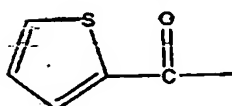
【化 39】



(14)

で示される残基、
化学式 (15) :

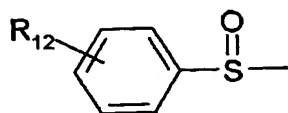
【化 40】



(15)

で示される残基、
化学式 (16) :

【化 4 1】



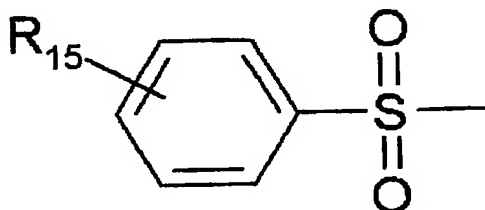
(16)

(式中、 R_{12} は芳香環への置換基を示し、 R_{12} はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 COOR_{13} 、 SO_2R_{14} (R_{13} : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_{14} : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基または $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_{12} は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、及び

化学式 (17) :

【化 4 2】



(17)

(式中、 R_{15} は芳香環への置換基を示し、 R_{15} はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 COOR_{16} 、 SO_2R_{17} (R_{16} : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_{17} : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基または $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_{15} は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群

からなる群より選択される1つ以上の残基であることを特徴とする請求項10記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項12】

前記化学式 (19) で示す ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸を含む培地中で前記微生物を培養することを特徴とする、請求項7乃至11のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項13】

前記化学式 (19) で示す ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸と、前記化学式 (20) で示す化合物もしくは前記化学式 (21) で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸とを含む培地中で前記微生物を培養することを特徴とする、請求項10又は11に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項14】

前記微生物の培養が、前記化学式 (19) で示す ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸に加えて、ペプチド類、酵母エキス、有機酸及びその塩、アミノ酸及びその塩、糖類、並びに、炭素数4から12の直鎖アルカン酸及びその塩からなる群より選択される少なくとも1種類を含む培地中で、前記微生物を培養することを特徴とする請求項12または13に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項15】

前記微生物の培養において、培地中に含有されるペプチド類がポリペプトンであり、また、培地中に含有される有機酸或いはその塩が、ピルビン酸、オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸、及びこれらの塩からなる群より選択される1つ以上の化合物であり、また、培地中に含有されるアミノ酸或いはその塩が、グルタミン酸、アシパラギン酸、及びこれらの塩からなる群より選択される1つ以上の化合物であり、また、培地中に含有される糖類が、グリセロアルデヒド、

エリトロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、グリセロール、エリトリトール、キシリトール、グルコン酸、グルクロン酸、ガラクトツロン酸、マルトース、スクロース、及びラクトースからなる群より選択される1つ以上の化合物であることを特徴とする請求項14に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項16】

前記微生物の培養が、二段階以上の培養工程を含むことを特徴とする請求項12乃至15のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項17】

前記二段階以上の培養工程を含む微生物の培養が、フェド・バッチ培養であることを特徴とする請求項16に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項18】

前記化学式(19)で示す ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸を含む培地中で前記微生物を培養し、前記微生物が産生した前記化学式(1)で示す3-ヒドロキシ ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットを少なくとも含むポリヒドロキシアルカノエートを微生物細胞から回収する工程を有することを特徴とする請求項12乃至17のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項19】

前記微生物として、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物を用いることを特徴とする請求項7乃至18のいずれかに記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項20】

前記微生物として、シュードモナス・チコリアイ YN2株 (*Pseudomonas cichorii* YN2; FERMBP-7375)、シュードモナス・チコリアイ H45株 (*Pseudomonas cichorii* H45; FERMBP-7374)、及びシュードモナス・ジェッセニイ P161株 (*Pseudomonas jesseni* P161; FERMBP-7376) のいずれか1つ以上の株を用いることを特徴とする請求項19に記載のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】側鎖に（フェニルメチル）オキシ構造を有するユニットを含む新規なポリヒドロキシアルカノエート及びその製造方法

【発明の属する技術分野】

【0001】

本発明は、新規なユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートと、微生物を利用するその製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

これまで、多くの微生物が、ポリ-3-ヒドロキシ酪酸（PHB）あるいはその他のポリヒドロキシアルカノエート（PHA）を生産し、その菌体内に蓄積することが報告されている。これらポリヒドロキシアルカノエートなどの微生物が産生するポリマーは、従来のプラスチックと同様に、溶融加工等により各種製品の生産に利用することができる。さらに、微生物が産生するポリマー、例えば、ポリヒドロキシアルカノエートなどは、生分解性を有しており、自然界の微生物により完全分解されるという利点を有している。従って、例えば、微生物が産生するポリヒドロキシアルカノエートは、廃棄した際、従来の多くの合成高分子化合物のように自然環境にそのまま残留し、汚染を引き起こす要因となることがない。また、微生物が産生するポリヒドロキシアルカノエートは、一般に生体適合性にも優れており、医療用軟質部材等としての応用も期待されている。

【0003】

この微生物産生ポリヒドロキシアルカノエートは、その生産に用いる微生物の種類、ならびに、培地組成、培養条件等により、様々な組成や構造のものとなり得ることも知られている。これまで、主にポリヒドロキシアルカノエートの物性の改良という観点から、微生物産生ポリヒドロキシアルカノエートの組成や構造の制御を試みる研究がなされてきた。

【0004】

微生物産生ポリヒドロキシアルカノエートの組成や構造の制御を目的とする研究の一つとして、近年、ユニット中に芳香環を有するポリヒドロキシアルカノエートを微生物に生産させる研究が盛んになされている。

【0005】

（a）フェニル基もしくはその部分置換体を含むもの

・ 5-フェニル吉草酸を基質として、シュードモナスオレオボランス（*Pseudomonas oleovorans*）が3-ヒドロキシ-5-フェニル吉草酸をユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートを生産することが報告されている（*Makromol. Chem.*, 191号、1990年、p. 1957-1965（非特許文献1）、*Macromolecules*, 24号、1991年、p. 5256-5260（非特許文献2））

・ 5-（p-トリル）吉草酸を基質として、シュードモナスオレオボランスが3-ヒドロキシ-5-（p-トリル）吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートを生産することが報告されている（*Macromolecules*, 29号、1996年、p. 1762-1766（非特許文献3））。

・ 5-（2, 4-ジニトロフェニル）吉草酸を基質として、シュードモナスオレオボランスが3-ヒドロキシ-5-（2, 4-ジニトロフェニル）吉草酸ユニット及び3-ヒドロキシ-5-（p-ニトロフェニル）吉草酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートを生産することが報告されている（*Macromolecules*, 32号、1999年、p. 2889-2895（非特許文献4））。

【0006】

（b）フェノキシ基もしくはその部分置換体を含むもの

・ 11-フェノキシウンデカン酸を基質として、シュードモナスオレオボランスが3-ヒドロキシ-5-フェノキシ吉草酸ユニットと3-ヒドロキシ-9-フェノキシノナン酸ユ

ニットを含むポリヒドロキシアリカノエート共重合体を生産することが報告されている (Macromol. Chem. Phys., 195号、1994年、p. 1665-1672 (非特許文献5))。

【0007】

3-ヒドロキシ-5- (モノフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (MFP) P) ユニット、あるいは3-ヒドロキシ-5- (ジフルオロフェノキシ) ペンタノエート (3H5 (DFP) P) ユニットからなる単独重合体; 少なくとも、3H5 (MFP) P ユニットあるいは3H5 (DFP) P ユニットを含有する共重合体; これらのポリマーの産生能を有するシュドモナス・プチダ; シュドモナス属を用いた、前記のポリマーの製造法に関する発明が開示されている。加えて、その発明の効果として、置換基を有する長鎖脂肪酸を資化して、側鎖末端に、1から2個のフッ素原子が置換したフェノキシ基をもつポリマーを合成することができ、また、かかるポリマーは、融点が高い上、良い加工性を保持しつつ、加えて、立体規則性、撥水性を与えることができる点を記載している。(特許第2989175号公報 (特許文献1))。

【0008】

このユニット中の芳香環上にフッ素置換を有するフッ素置換PHA以外に、ユニット中の芳香環上にシアノ基やニトロ基が置換したポリヒドロキシアリカノエートの研究もなされている。

【0009】

シュドモナスオレオボランスATCC29347株及びシュドモナスプチダ (Pseudomonas putida) KT2442株を用いて、オクタン酸と6- (p-シアノフェノキシ) ヘキサン酸あるいは6- (p-ニトロフェノキシ) ヘキサン酸を基質として、3-ヒドロキシ-6- (p-シアノフェノキシ) ヘキサン酸あるいは3-ヒドロキシ-6- (p-ニトロフェノキシ) ヘキサン酸をモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアリカノエートの生産が報告されている (Can. J. Microbiol., 41号、1995年、p. 32-43 (非特許文献6)、Polymer International, 39号、1996年、p. 205-213 (非特許文献7))。

【0010】

これら環上に置換基を持つ芳香環を有するユニットを含むポリヒドロキシアリカノエートは、ガラス転移温度が高く、加工性も良いという、芳香環に由来するポリマー性状を維持しつつ、芳香環上に存在している置換基に由来する新たな機能も付与された、多機能のポリヒドロキシアリカノエートとなる。

【0011】

また、その一方で、ユニット中にブロモ基を有するポリヒドロキシアリカノエートを基に、生産ポリマーに対して、前記ブロモ基を利用する化学変換により任意の官能基をポリマー側鎖に導入し、多機能のポリヒドロキシアリカノエートを得ることを目的とした研究も盛んに行われている。

【0012】

シュドモナスオレオボランスを用いて、側鎖にブロモ基を有するポリヒドロキシアリカノエートを生産し、アセチル化マルトースのチオール化物を側鎖に修飾し、その溶解性や親水性の異なるポリヒドロキシアリカノエートを合成したことが報告されている (Macromol. Rapid Commun., 20号、1999年、p. 91-94 (非特許文献8))。

【0013】

シュドモナス・オレオボランス (Pseudomonas oleovorans) を用いて側鎖にビニル基を有するポリエステルを生産し、ポリエステル分子内のビニル基を酸化することにより、エポキシ基を側鎖に有するポリエステルを生産したことが報告されている (Polymer, 41号、2000年、p. 1703-1709 (非特許文献9))。

【0014】

シュードモナス・オレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) を用いて側鎖にビニル基を有するポリエステルを生産し、ビニル基をエポキシ化することにより、エポキシ基を側鎖に有するポリエステルを生産したことが報告されている (*Macromolecules*, 31号, 1998年, p. 1480-1486 (非特許文献10))。

【0015】

ポリエステル側鎖のビニル基を利用し、ポリエステル分子内の架橋反応を行い、ポリエステルの物性を改良したことが報告されている (*Polymer*, 35号, 1994年, p. 2090-2097 (非特許文献11))。

【0016】

ユニット中に活性基を有するPHAの物性を変化させ、ポリマーとして実際に利用していくために、活性基を有するユニット以外のユニットを含むPHA共重合体を微生物合成することが検討されており、シュードモナスオレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*) を用いて、11-プロモウンデカン酸、8-プロモオクタン酸、6-プロモヘキサン酸といった ω -プロモアルカン酸とn-ノナン酸の共存下で3-ヒドロキシ ω -プロモアルカン酸ユニットと直鎖アルカン酸ユニットを含むPHA共重合体を生産した例が報告されている (*Macromolecules*, 25号, 1992年, p. 1852-1857 (非特許文献12))。

【0017】

このように、ユニット中にプロモ基やビニル基のような反応性が高い活性基を有するPHAでは、様々な官能基の導入や、化学的変換を施すことが可能であり、また、ポリマーの架橋点ともなり得るため、活性基を有するPHAは、PHAの多機能化を図る上で非常に有効な方法であると言える。

【特許文献1】特許第2989175号公報

【非特許文献1】*Makromol. Chem.*, 191号, 1990年, p. 1957-1965

【非特許文献2】*Macromolecules*, 24号, 1991年, p. 5256-5260

【非特許文献3】*Macromolecules*, 29号, 1996年, p. 1762-1766

【非特許文献4】*Macromolecules*, 32号, 1999年, p. 2889-2895

【非特許文献5】*Macromol. Chem. Phys.*, 195号, 1994年, p. 1665-1672

【非特許文献6】*Can. J. Microbiol.*, 41号, 1995年, p. 32-43

【非特許文献7】*Polymer International*, 39号, 1996年, p. 205-213

【非特許文献8】*Macromol. Rapid Commun.*, 20号, 1999年, p. 91-94

【非特許文献9】*Polymer*, 41号, 2000年, p. 1703-1709

【非特許文献10】*Macromolecules*, 31号, 1998年, p. 1480-1486

【非特許文献11】*Polymer*, 35号, 1994年, p. 2090-2097

【非特許文献12】*Macromolecules*, 25号, 1992年, p. 1852-1857

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

しかしながら、プロモ基を活性基とするPHAを微生物合成する場合は、得られるPH

Aの生産性が低く、PHA共重合体を微生物合成した場合は、プロモ基のユニット比を高くすることや、ユニット比を制御することが困難であった。

【0019】

また、ビニル基を活性基とするPHAの場合も、アルキル鎖の先端にビニル基がある場合には、ガラス転移温度や融点が低く、ポリマーの加工上及び使用上好ましい物性とは言えなかった。

【0020】

以上の点から、活性基を有するPHAの微生物による生産性が高く、活性基を有する側鎖のユニット比を制御でき、さらにポリマーとしての応用が制限されないように物性を任意に制御し得るようなPHA及びその製造方法が求められていた。

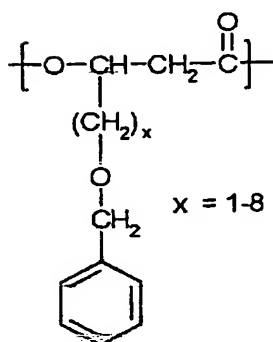
【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究の結果、反応性の高い（フェニルメチル）オキシ構造を活性基として有するユニットを含むPHAを微生物合成する方法を見出し、本発明に至った。即ち、本発明は、化学式（1）：

【0022】

【化1】



（1）

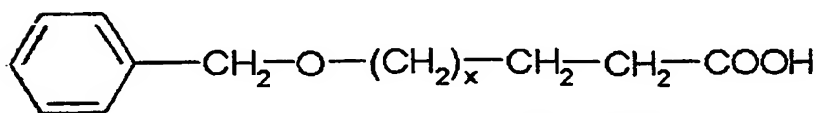
（xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る）
に示す3-ヒドロキシ- ω -〔（フェニルメチル）オキシ〕アルカン酸ユニットを含むポリヒドロキシアルカノエートである。

【0023】

また本発明は、化学式（19）：

【0024】

【化2】

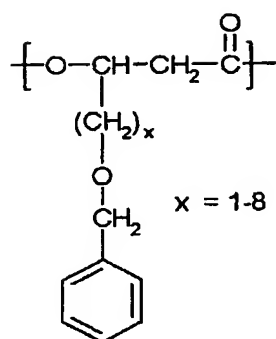


（19）

（xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る）
で示す ω -〔（フェニルメチル）オキシ〕アルカン酸を含む条件下で、
前記化学式（19）で示す ω -〔（フェニルメチル）オキシ〕アルカン酸を原料として、
化学式（1）：

【0025】

【化3】



(1)

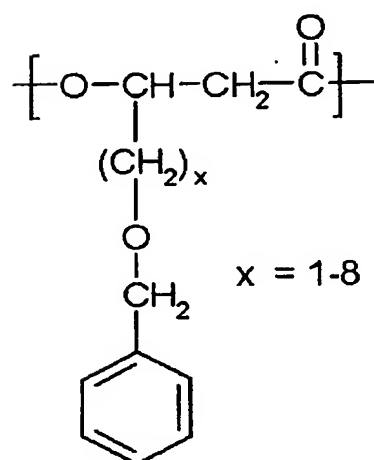
(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

で示す3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエートを生産する能力を有する微生物により生合成せしめることを特徴とする、

前記化学式(1)：

【0026】

【化4】



(1)

(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

で示す3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットを分子中に含むポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法である。

【発明の効果】

【0027】

本発明により、新規ポリヒドロキシアлкаノエート共重合体である、側鎖に[(フェニルメチル)オキシ]構造を有するユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート及び、側鎖に[(フェニルメチル)オキシ]構造を有するユニットと、側鎖にフェニル構造、チエニル構造、シクロヘキシル構造のいずれかを有する残基を含むユニットとを分子中に同時に含むポリヒドロキシアлкаノエートが提供された。

【0028】

また、PHAの生産性が高く、[(フェニルメチル)オキシ]構造を有する側鎖のユニット比を制御でき、さらに生産されるPHAの物性を制御し得るPHAの製造方法が提供された。

【発明を実施するための最良の形態】

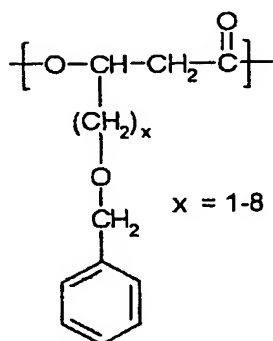
【0029】

本発明のポリヒドロキシアлкаノエート(PHA)は、化学式(1)に示す3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットを含むことを特徴とするポ

リヒドロキシアルカノエートである。

【0030】

【化5】



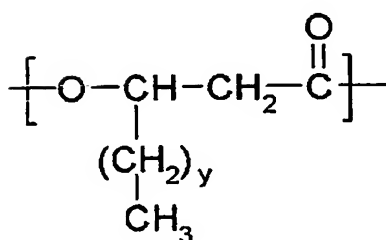
(1)

(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

また、前記化学式(1)に示すユニット以外に、化学式(2)及び(3)に示すユニットの少なくとも一つを含むポリヒドロキシアルカノエートである。

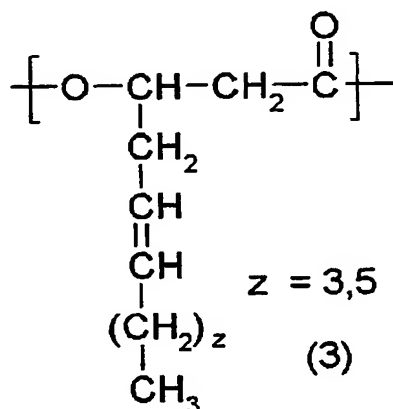
【0031】

【化6】



$y = 1-8$

(2)



(3)

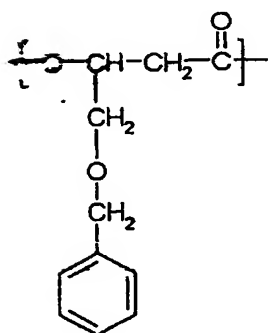
(y及びzは化学式(1)で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。)

さらに、前記化学式(1)に示す3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットが、

化学式(6)：

【0032】

【化7】

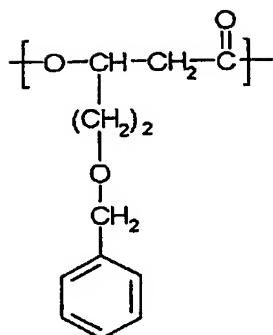


(6)

に示す3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸ユニット、及び
化学式(7)：

【0033】

【化8】



(7)

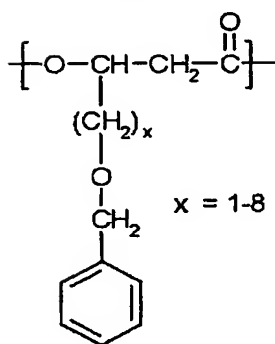
に示す3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニット、
のうちのいずれか一つ以上であるポリヒドロキシアルカノエートである。

【0034】

特に、前記化学式(1)：

【0035】

【化9】



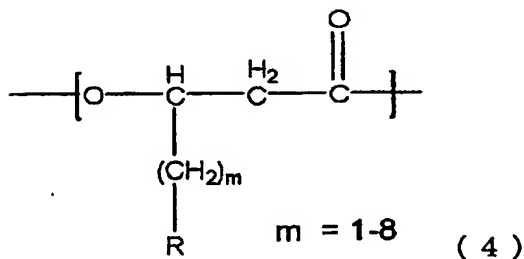
(1)

(xは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

に示す3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットと、
化学式(4)：

【0036】

【化10】



(mは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る；Rはフェニル構造
或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

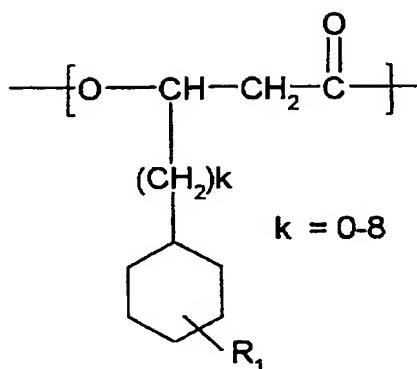
で示すユニット、

もしくは

化学式(5)：

【0037】

【化11】



(式中、 R_1 はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_1 はH原子、CN基、 NO_2 基、ハロゲン原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、 k は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)
 に示す3-ヒドロキシ- ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニットと
 を少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシアルカノエートである。

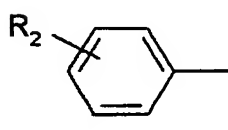
【0038】

また、前記化学式(4)におけるR、即ちフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基が、

化学式(8)：

【0039】

【化12】



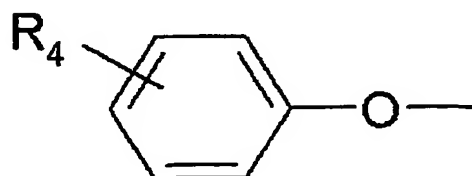
(式中、 R_2 は芳香環への置換基を示し、 R_2 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $CH=CH_2$ 基、 $COOR_3$ (R_3 : H原子、Na原子、K原子のいずれかを表す)、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_2 は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(9)：

【0040】

【化13】



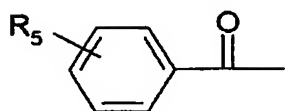
(式中、 R_4 は芳香環への置換基を示し、 R_4 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 SCH_3 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_4 は、異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(10)：

【0041】

【化14】



(10)

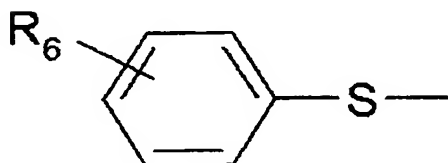
(式中、 R_5 は芳香環への置換基を示し、 R_5 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_5 は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(11)：

【0042】

【化15】



(11)

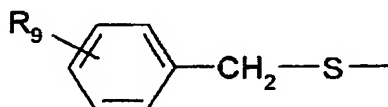
(式中、 R_6 は芳香環への置換基を示し、 R_6 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_7$ 、 SO_2R_8 (R_7 : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_8 : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_6 は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(12)：

【0043】

【化16】



(12)

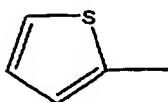
(式中、 R_9 は芳香環への置換基を示し、 R_9 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_{10}$ 、 SO_2R_{11} (R_{10} : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_{11} : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_9 は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式(13)：

【0044】

【化17】



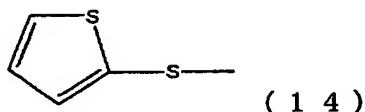
(13)

で示される残基、

化学式(14)：

【0045】

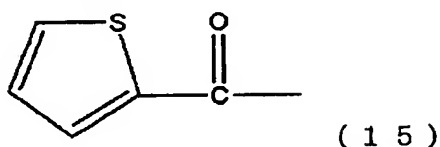
【化18】



で示される残基、
化学式 (15) :

【0046】

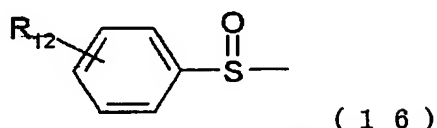
【化19】



で示される残基、
化学式 (16) :

【0047】

【化20】



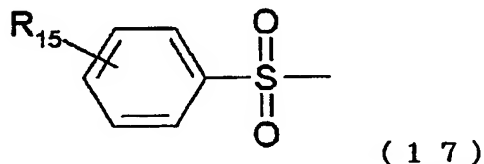
(式中、 R_{12} は芳香環への置換基を示し、 R_{12} はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_{13}$ 、 SO_2R_{14} (R_{13} : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_{14} : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_{12} は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、及び

化学式 (17) :

【0048】

【化21】



(式中、 R_{15} は芳香環への置換基を示し、 R_{15} はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_{16}$ 、 SO_2R_{17} (R_{16} : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_{17} : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_{15} は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群

からなる群より選択される1つ以上の残基であるポリヒドロキシアルカノエートである。

【0049】

特に、数平均分子量が1000から1000000の範囲であるポリヒドロキシアルカノエートである。

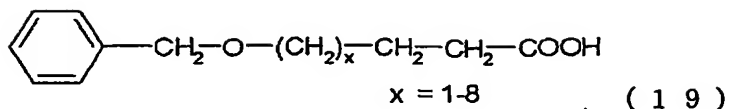
【0050】

本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法は、

化学式 (19) :

【0051】

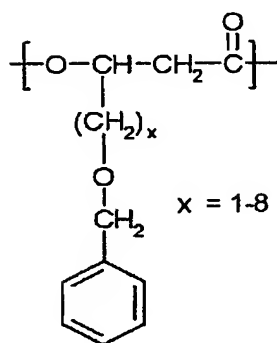
【化 2 2】



(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)
 で示す ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸を含む条件下で、
 前記化学式 (19) で示す ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸を原料として、
 化学式 (1) :

【0052】

【化 2 3】



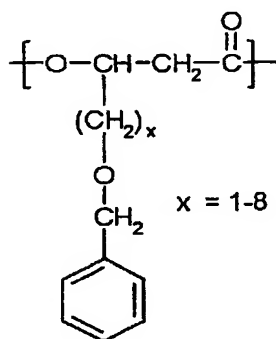
(1)

(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)
 で示す 3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸ユニットを分子中
 に含むポリヒドロキシアлкаノエートを生産する能力を有する微生物により生合成せしめ
 ることを特徴とする、

前記化学式 (1) :

【0053】

【化 2 4】



(1)

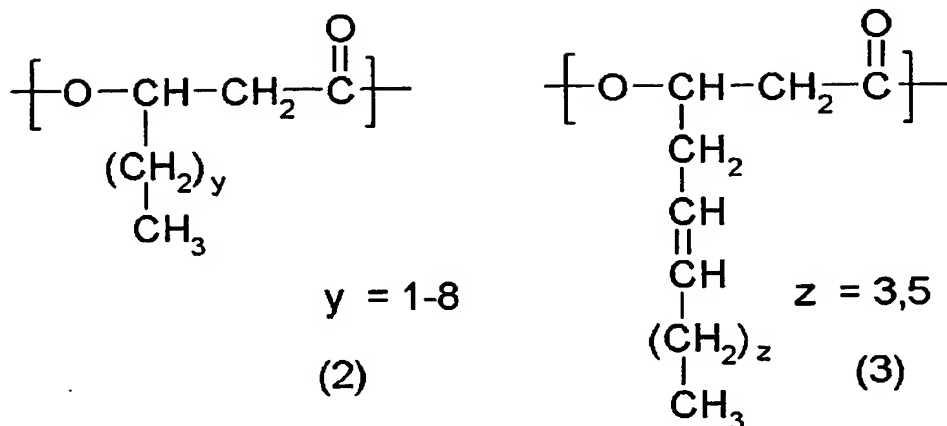
(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)
 で示す 3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸ユニットを分子中
 に含むポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法である。

【0054】

また、前記化学式 (1) で示されるユニットに加えて、下記化学式 (2) 及び (3) に
 示されるユニットの少なくとも一つを含むポリヒドロキシアлкаノエートの製造方法であ
 る。

【0055】

【化25】

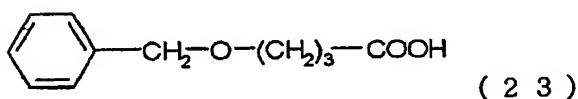


(y 及び z は化学式 (1) で示すユニットと独立して化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る。)

さらに、前記化学式 (19) に示す ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸が、化学式 (23) :

【0056】

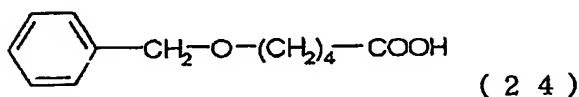
【化26】



に示す 4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸、及び化学式 (24) :

【0057】

【化27】



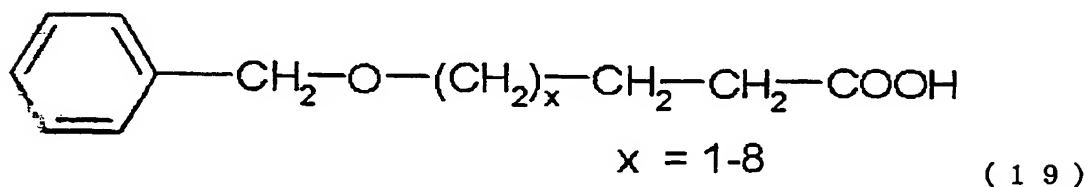
に示す 5-[(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸のうちいずれか1つ以上であるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0058】

特に、前記化学式 (19) :

【0059】

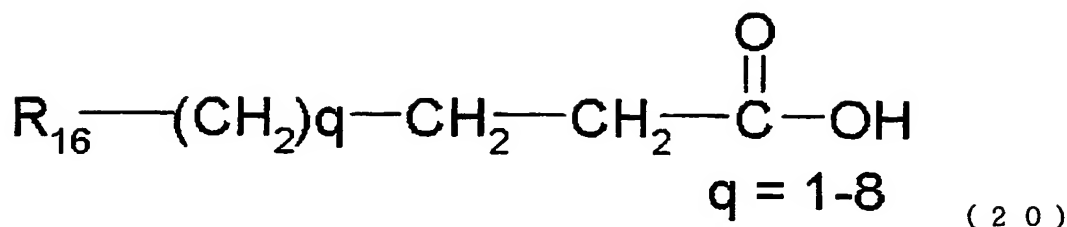
【化28】



(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)
で示す ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸と、化学式 (20) :

【0060】

【化29】



(q は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る; R_{16} はフェニル構造、或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

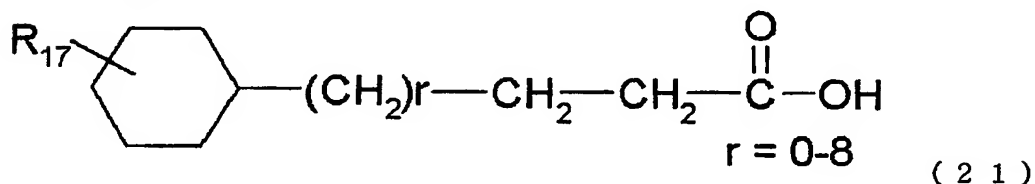
で示す化合物、

もしくは

化学式 (21) :

【0061】

【化30】



(式中、 R_{17} はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_{17} は H 原子、CN 基、 NO_2 基、ハロゲン原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、また、 r は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸と

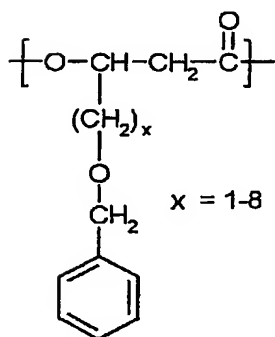
を含む条件下で、

前記化学式 (19) で示す ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸、及び前記化学式 (20) で示す化合物もしくは前記化学式 (21) で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸を原料として、

前記化学式 (1) :

【0062】

【化31】



(1)

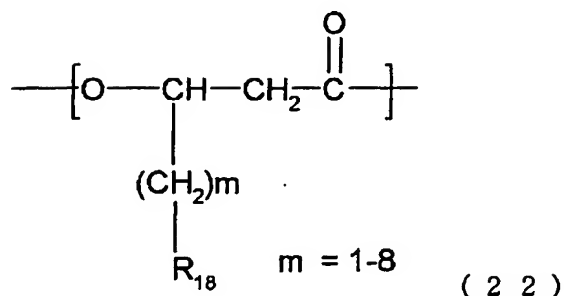
(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

で示す 3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル) オキシ] アルカン酸ユニットと、

化学式 (22) :

【0063】

【化 3 2】



(mは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値を取り得る；R₁₈はフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

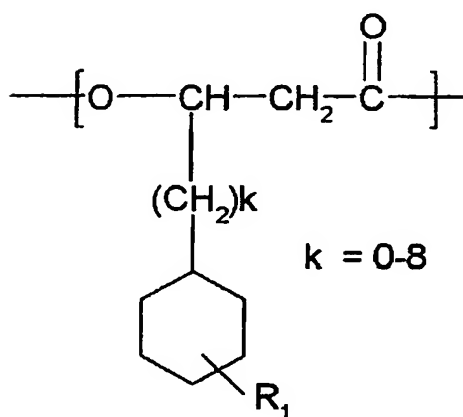
で示すユニット

もしくは

化学式 (5) :

【0064】

【化 3 3】



(5)

(式中、R₁はシクロヘキシル基への置換基を示し、R₁はH原子、CN基、NO₂基、ハロゲン原子、CH₃基、C₂H₅基、C₃H₇基、CF₃基、C₂F₅基またはC₃F₇基であり、また、kは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値を取り得る)

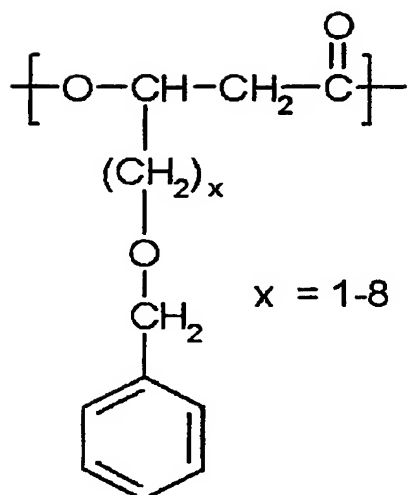
に示す3-ヒドロキシ-ω-シクロヘキシルアルカン酸ユニットと

を少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシルアルカノエートを生産する能力を有する微生物により生合成せしめることを特徴とする、

前記化学式 (1) :

【0065】

【化34】

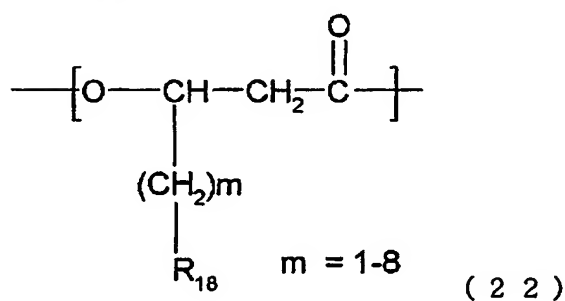


(1)

(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値を取り得る)
 で示す3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットと、
 前記化学式(22)：

【0066】

【化35】



(m は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値を取り得る； R_{18} はフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基を含んでいる)

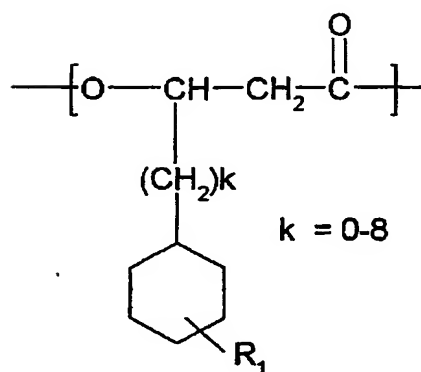
で示すユニット

もしくは

前記化学式(5)：

【0067】

【化36】



(5)

(式中、 R_1 はシクロヘキシル基への置換基を示し、 R_1 はH原子、CN基、 NO_2 基、ハロゲン原子、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、

また、kは化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)
 に示す3-ヒドロキシ- ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニットと
 を少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

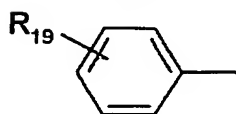
【0068】

また、前記化学式(20)における R_{16} 及び前記化学式(22)における R_{18} 、即ちフェニル構造或いはチエニル構造のいずれかの構造を有する残基が、

化学式(25)：

【0069】

【化37】



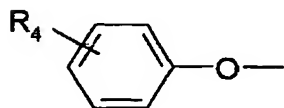
(25)

(式中、 R_{19} は芳香環への置換基を示し、 R_{19} はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $CH=CH_2$ 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_{19} は、ユニット毎に異なってもよい。)で示される残基群、

化学式(9)：

【0070】

【化38】



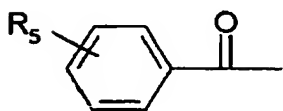
(9)

(式中、 R_4 は芳香環への置換基を示し、 R_4 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 SCH_3 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_4 は、ユニット毎に異なってもよい。)で示される残基群、

化学式(10)：

【0071】

【化39】



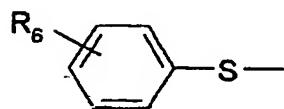
(10)

(式中、 R_5 は芳香環への置換基を示し、 R_5 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 CF_3 基、 C_2F_5 基または C_3F_7 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_5 は、ユニット毎に異なってもよい。)で示される残基群、

化学式(11)：

【0072】

【化40】



(11)

(式中、 R_6 は芳香環への置換基を示し、 R_6 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_7$ 、 SO_2R_8 (R_7 : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_8 : O、H、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、C

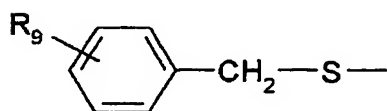
C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基または $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_6 は、ユニット毎に異なってもよい。）

で示される残基群、

化学式 (12) :

【0073】

【化41】



(12)

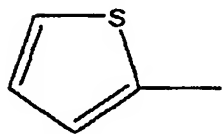
(式中、 R_9 は芳香環への置換基を示し、 R_9 はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 COOR_{10} 、 SO_2R_{11} (R_{10} : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_{11} : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$ 基または $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_9 は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、

化学式 (13) :

【0074】

【化42】



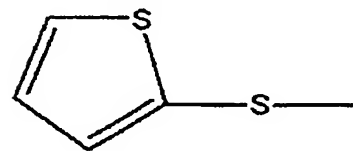
(13)

で示される残基、

化学式 (14) :

【0075】

【化43】



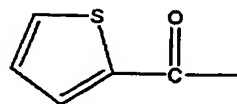
(14)

で示される残基、

化学式 (15) :

【0076】

【化44】



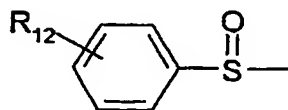
(15)

で示される残基、

化学式 (16) :

【0077】

【化45】



(16)

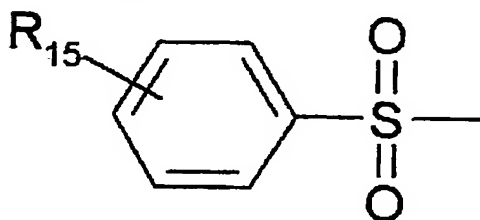
(式中、 R_{12} は芳香環への置換基を示し、 R_{12} はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_{13}$ 、 SO_2R_{14} (R_{13} : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_{14} : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_{12} は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群、及び

化学式 (17) :

【0078】

【化46】



(17)

(式中、 R_{15} は芳香環への置換基を示し、 R_{15} はH原子、ハロゲン原子、CN基、 NO_2 基、 $COOR_{16}$ 、 SO_2R_{17} (R_{16} : H、Na、K、 CH_3 、 C_2H_5 のいずれかを表し、 R_{17} : OH、ONa、OK、ハロゲン原子、 OCH_3 、 OC_2H_5 のいずれかを表す)、 CH_3 基、 C_2H_5 基、 C_3H_7 基、 $(CH_3)_2-CH$ 基または $(CH_3)_3-C$ 基であり、複数のユニットが存在する場合、 R_{15} は、ユニット毎に異なってもよい。)

で示される残基群

からなる群より選択される1つ以上の残基であるポリヒドロキシアルカノエートの製造方法である。

【0079】

なお、前述した化学式の有するx、y、z、m、q、r、k、R及びR1~19は、これらをそれぞれ含むモノマーユニット又はモノマーの2種以上が用いられている場合に、各モノマーユニット又はモノマーごとに独立して上記の意味を表す。

【0080】

本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法は、前記化学式(19)で示すω-[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸に加えて、ペプチド類、酵母エキス、有機酸及びその塩、アミノ酸及びその塩、糖類、並びに、炭素数4から12の直鎖アルカン酸及びその塩からなる群より選択される少なくとも1種類を含む培地中で、前記微生物を培養することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの製造方法とすることができる。さらに、前記微生物の培養において、培地中に含有されるペプチド類がポリペプトンであり、また、培地中に含有される有機酸或いはその塩が、ピルビン酸、オキサロ酢酸、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、乳酸、及びこれらの塩からなる群より選択される1つ以上の化合物であり、また、培地中に含有されるアミノ酸或いはその塩が、グルタミン酸、アスパラギン酸、及びこれらの塩からなる群より選択される1つ以上の化合物であり、また、培地中に含有される糖類が、グリセロアルデヒド、エリトロース、アラビノース、キシロース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、グリセロール、エリトリール、キシリトリール、グルコン酸、グルクロン酸、ガラクトツロン酸、マルトース、スクロース、及びラクトースからなる群より選択される1つ以上の化合物とすることができる。

【0081】

本発明のポリヒドロキシアルカノエートの製造方法における微生物の培養条件の詳細は、以下のとおりである。

【0082】

リン酸緩衝液及びアンモニウム塩或いは硝酸塩を基本とした無機塩培地に、以下に示すように種々の必要基質及び栄養素を加える。

【0083】

目的とする前記化学式(1)で示す3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル)アルカン酸ユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエートを生産するための基質として、前記化学式(19)で示す ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸を含むことが好ましく、より好ましくは、培地あたり0.01%から1%(w/v)、更に好ましくは0.02%から0.2%の割合で含有していることが望ましい。

【0084】

また、3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットに加えて、前記化学式(22)に示すユニットもしくは前記化学式(5)に示す3-ヒドロキシ- ω -シクロヘキシルアルカン酸ユニットとを少なくとも分子中に同時に含むポリヒドロキシアлкаノエートを生産するためには、基質として前記化学式(19)で示す ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸、及び前記化学式(20)で示す化合物もしくは前記化学式(21)で示す ω -シクロヘキシルアルカン酸を含むことが好ましく、より好ましくは、培地あたりそれぞれ0.01%から1%(w/v)、更に好ましくは0.02%から0.2%の割合で含有していることが望ましい。

【0085】

微生物増殖のための炭素源及び窒素源、ポリヒドロキシアлкаノエート生産のためのエネルギー供給源として加える上記の共存基質濃度は、通常培地あたり0.1%から5%(w/v)、更に好ましくは0.2%から2%の割合で含有していることが望ましい。

【0086】

本発明で用いる培地としては、リン酸塩及びアンモニウム塩或いは硝酸塩等の窒素源を含む無機塩培地ならいかなる培地でも良いが、窒素源の濃度を調節することでPHAの生産性を向上せしめることが可能である。

【0087】

培養温度としては菌株が良好に増殖可能な温度であれば良く、15℃から37℃、更に好ましくは20℃から30℃程度が適当である。

【0088】

培養方法としては、微生物が増殖し、PHAを生産する方法であればいかなるものでも良く、液体培養、固体培養等を問わない。また、通常のバッチ培養などの一段階培養の他に、一段階培養によって得られた菌体を一度回収し、それを新たに別の培地に添加し、再び培養を行うような二段階培養を用いることができる。また、この二段階培養をより簡便に行うため、菌体を回収せずに培養液にそのまま新たな培地を添加するフェド・バッチ培養を用いることも可能である。さらに連続培養を用いることもできる。

【0089】

培養形態としても、フラスコ等の培養容器を振盪する方法、フーマンターによる方法等、いかなるものを用いても良い。

【0090】

微生物にPHAを生産・蓄積せしめる方法としては、上に示した方法の他に、一旦十分に増殖させて後に、塩化アンモニウムのような窒素源を制限した培地へ菌体を移し、目的ユニットの基質となる化合物を加えた状態で更に培養すると生産性が向上する場合がある。

【0091】

更に、上記のような条件下で微生物を培養し、微生物が産生した前記化学式(1)で示す3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエートを微生物細胞から回収する工程を有することができる。

【0092】

微生物細胞から目的のPHAを回収する方法としては、通常行なわれている方法を適用することができる。例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、酢酸エチル、アセトンなどの有機溶媒による抽出が最も簡便ではあるが、それ以外にジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリルが用いられる場合もある。また、有機溶媒が使用しにくい環境中にお

いては、SDS等の界面活性剤による処理、リゾチーム等の酵素による処理、次亜塩素酸塩、アンモニア、EDTA等の薬剤による処理、或いは超音波破碎法、ホモジナイザー法、圧力破碎法、ビーズ衝撃法、摩砕法、擂潰法、凍結融解法のいずれかの方法を用いて微生物細胞を物理的に破碎することによって、PHA以外の菌体成分を除去して、PHAを回収する方法を用いることもできる。

【0093】

本発明の製造方法で用いる微生物としては、前記条件を満たす能力を有する微生物であれば如何なる微生物でも良いが、中でも特にシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物が望ましく、更に詳しくはシュードモナスチコリアイ (*Pseudomonas cicchorii*)、シュードモナスプチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナスフルオレンセス (*Pseudomonas fluorescens*)、シュードモナスオレオボランス (*Pseudomonas oleovorans*)、シュードモナスアルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナススツツヅエリ (*Pseudomonas stutzeri*)、シュードモナスジェッセニイ (*Pseudomonas jesseni*) 等が望ましい。更に詳しくは、シュードモナスチコリアイYN2株 (*Pseudomonas cicchorii* YN2; FERMBP-7375)、シュードモナスチコリアイH45株 (*Pseudomonas cicchorii* H45; FERMBP-7374)、シュードモナスジェッセニイP161株 (*Pseudomonas jesseni* P161; FERMBP-7376) が挙げられる。これら3種の微生物は独立行政法人産業技術総合研究所(旧通商産業省工業技術院)生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センターに寄託されており、特開2002-80571号公報に記載されている微生物である。

【0094】

なお、本発明の微生物の培養、本発明の微生物によるPHAの生産と菌体への蓄積、並びに、本発明における菌体からのPHAの回収は、上記の方法に限定されるものではない。

【0095】

本発明の一方法に用いた無機塩培地(M9培地)の組成を以下に示す。

【0096】

〔M9培地〕

Na_2HPO_4 : 6.3 g/L

KH_2PO_4 : 3.0 g/L

NH_4Cl : 1.0 g/L

NaCl : 0.5 g/L、pH=7.0

更に、良好な増殖及びPHAの生産のためには、上記の無機塩培地に以下に示す微量成分溶液を0.3% (v/v) 程度添加する必要がある。

【0097】

〔微量成分溶液〕

ニトリロ三酢酸: 1.5; MgSO_4 : 3.0; MnSO_4 : 0.5; NaCl : 1.0; FeSO_4 : 0.1; CaCl_2 : 0.1; CoCl_2 : 0.1; ZnSO_4 : 0.1; CuSO_4 : 0.1; $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$: 0.1; H_3BO_3 : 0.1; Na_2MoO_4 : 0.1; NiCl_2 : 0.1 (単位: g/L)

【実施例】

【0098】

実施例中の「%」は「% (w/v)」を示す。

【0099】

〔実施例1〕

D-グルコース0.5%、ポリペプトン0.1%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離

により回収し、D-グルコース 0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸 0.1%を含む M9 培地 200 mL に再懸濁して、更に、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0100】

この凍結乾燥ペレットを 20 mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 33 mg 得た。

【0101】

得られた PHA は、以下の条件で NMR 分析を行った。

<測定機器>

FT-NMR: Bruker DPX 400

共鳴周波数: $^1\text{H} = 400 \text{ MHz}$

<測定機器>

測定核種: ^1H

使用溶媒: CDCl_3

測定温度: 室温

^1H -NMR スペクトルチャートを図 1 に、その同定結果を表 1 にそれぞれ示す。

【0102】

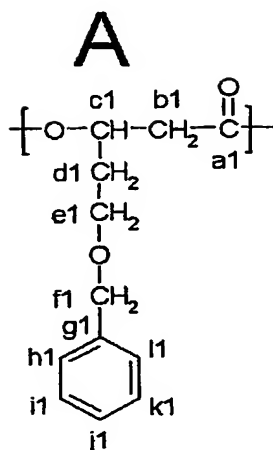
【表 1】

Chemical shift (ppm)	帰属	分裂	積分比
1.86	d1	m	2H
2.54	b1	m	2H
3.44	e1	m	2H
4.41	f1	s	2H
5.31	c1	m	1H
7.20~7.31	h1 i1 j1 k1 l1	m	5H

表 1 に示す通り、当該 PHA は、以下の化学式 (26) で表される 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸をモノマーユニットとして含み、且つ 3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHA であることが確認された。また、得られた PHA は、 ^1H -NMR スペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを 94.9 mol% 含むことがわかった。

【0103】

【化 47】



(2 6)

また、得られたPHAの分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC；東ソーHLC-8220、カラム；東ソーTSK-GEL Super HM-H、溶媒；クロロホルム、ポリスチレン換算）により評価した結果、 $M_n = 123000$ 、 $M_w = 293000$ であった。

【0104】

【実施例2】

D-グルコース0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュドモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%を含む、窒素源（ NH_4Cl ）を含まないM9培地200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0105】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 μm のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを30mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸をモノマーユニットとして含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、 1H -NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを92.5±0.1%含むことがわかった。

【0106】

【実施例3】

D-グルコース0.5%、ポリペプトン0.1%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュドモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%を含むM9培地200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0107】

この凍結乾燥ペレットを20 mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを31 mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを91.6 mol %含むことがわかった。

【0108】

[実施例4]

D-グルコース0.5%、ポリペプトン0.1%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200 mLに、シュードモナス・ジェッセニイ・P161株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%を含むM9培地200 mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0109】

この凍結乾燥ペレットを20 mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを29 mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを90.8 mol %含むことがわかった。

【0110】

[実施例5]

D-グルコース0.5%、ポリペプトン0.1%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200 mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、D-グルコース5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸1%を含む水溶液20 mLを添加して更に30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0111】

この凍結乾燥ペレットを20 mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45 μ mのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを25 mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-

ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを79.7m
o1%含むことがわかった。

【0112】

【実施例6】

ポリペプトン0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュドモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0113】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを24mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを77.8m
o1%含むことがわかった。

【0114】

【実施例7】

ポリペプトン0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュドモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0115】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを20mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを74.2m
o1%含むことがわかった。

【0116】

【実施例8】

酵母エキス0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュドモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0117】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロー

タリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを16mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを75.9mol%含むことがわかった。

【0118】

[実施例9]

グルコース0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・ジェッセニイ・P161株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0119】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを17mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを81.5mol%含むことがわかった。

【0120】

[実施例10]

ピルビン酸0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0121】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを10mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを88.5mol%含むことがわかった。

【0122】

[実施例11]

グルタミン酸ナトリウム0.5%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、

冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0123】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを12mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを86.3mol%含むことがわかった。

【0124】

【実施例12】

ノナン酸0.1%、5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・ジェッセニイ・P161株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0125】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを9mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、化学式(26)で表される3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを含み、且つそれ以外のモノマーユニットが3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む、PHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸のモノマーユニットを24.5mol%含むことがわかった。

【0126】

【実施例13】

D-グルコース0.5%、ポリペプトン0.1%、4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース0.5%、4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸0.1%を含むM9培地200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0127】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを30mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニル

メチル) オキシ] 酪酸のモノマーユニットを 92.4 mol % 含むことがわかった。

【0128】

また、得られた PHA の分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC ; 東ソー HLC-8220、カラム ; 東ソー TSK-GEL Super HM-H、溶媒 ; クロロホルム、ポリスチレン換算) により評価した結果、 $M_n = 138000$ 、 $M_w = 294000$ であった。

【0129】

[実施例 14]

D-グルコース 0.5 %、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸 0.1 % とを含む M9 培地 200 mL に、シュードモナス・チコリアイ・YN2 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、D-グルコース 0.5 %、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸 0.1 % を含む、窒素源 (NH_4Cl) を含まない M9 培地 200 mL に再懸濁して、更に、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0130】

この凍結乾燥ペレットを 20 mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 26 mg 得た。実施例 1 と同様の条件で NMR 分析を行った結果、得られた PHA は、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸をモノマーユニットとして含み、且つ 3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む PHA であることが確認された。また、得られた PHA は、 1H -NMR スペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸のモノマーユニットを 90.5 mol % 含むことがわかった。

【0131】

[実施例 15]

D-グルコース 0.5 %、ポリペプトン 0.1 %、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸 0.1 % とを含む M9 培地 200 mL に、シュードモナス・チコリアイ・YN2 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、D-グルコース 5 %、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸 1 % を含む水溶液 20 mL を添加して更に 30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0132】

この凍結乾燥ペレットを 20 mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μm のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 20 mg 得た。実施例 1 と同様の条件で NMR 分析を行った結果、得られた PHA は、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸のモノマーユニットを含み、且つ 3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む PHA であることが確認された。また、得られた PHA は、 1H -NMR スペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸のモノマーユニットを 76.8 mol % 含むことがわかった。

【0133】

[実施例 16]

ポリペプトン 0.5 %、4-[(フェニルメチル) オキシ] 酪酸 0.1 % とを含む M9 培地 200 mL に、シュードモナス・チコリアイ・YN2 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、ピルビン酸 0

、5%、4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸0.1%を含む、窒素源(NH₄Cl)を含まないM9培地200mLに再懸濁して、更に、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0134】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを19mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを73.2mol%含むことがわかった。

【0135】

【実施例17】

ポリペプトン0.5%、4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・YN2株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0136】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを15mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを76.7mol%含むことがわかった。

【0137】

【実施例18】

酵母エキス0.5%、4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸0.1%とを含むM9培地200mLに、シュードモナス・チコリアイ・H45株を植菌し、30℃、125ストローク/分で振盪培養した。48時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0138】

この凍結乾燥ペレットを20mLクロロホルムに懸濁し、60℃で20時間攪拌してPHAを抽出した。抽出液を孔径0.45μmのメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥してPHAを14mg得た。実施例1と同様の条件でNMR分析を行った結果、得られたPHAは、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つ3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含むPHAであることが確認された。また、得られたPHAは、¹H-NMRスペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを75.5mol%含むことがわかった。

【0139】

【実施例 19】

グルコース 0.5%, 4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸 0.1% とを含む M9 培地 200 mL に、シュードモナス・ジェッセニイ・P161 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0140】

この凍結乾燥ペレットを 20 mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 11 mg 得た。実施例 1 と同様の条件で NMR 分析を行った結果、得られた PHA は、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つ 3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む PHA であることが確認された。また、得られた PHA は、¹H-NMR スペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを 85.9 mol% 含むことがわかった。

【0141】

【実施例 20】

ピルビン酸 0.5%, 4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸 0.1% とを含む M9 培地 200 mL に、シュードモナス・チコリアイ・YN2 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0142】

この凍結乾燥ペレットを 20 mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 8 mg 得た。実施例 1 と同様の条件で NMR 分析を行った結果、得られた PHA は、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つ 3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む PHA であることが確認された。また、得られた PHA は、¹H-NMR スペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを 90.4 mol% 含むことがわかった。

【0143】

【実施例 21】

グルタミン酸ナトリウム 0.5%, 4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸 0.1% とを含む M9 培地 200 mL に、シュードモナス・チコリアイ・H45 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0144】

この凍結乾燥ペレットを 20 mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 10 mg 得た。実施例 1 と同様の条件で NMR 分析を行った結果、得られた PHA は、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つ 3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む PHA であることが確認された。また、得られた PHA は、¹H-NMR スペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを 84.3 mol% 含むことがわかった。

【0145】

【実施例 22】

ノナン酸 0.1%、4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸 0.1%とを含む M9 培地 200 mL に、シュードモナス・ジェッセニイ・P161 株を植菌し、30℃、125 ストローク/分で振盪培養した。48 時間後、菌体を遠心分離により回収し、冷メタノールにて一度洗浄して凍結乾燥した。

【0146】

この凍結乾燥ペレットを 20 mL クロロホルムに懸濁し、60℃で 20 時間攪拌して PHA を抽出した。抽出液を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷メタノールで再沈殿させ、更に沈殿のみを回収して真空乾燥して PHA を 7 mg 得た。実施例 1 と同様の条件で NMR 分析を行った結果、得られた PHA は、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを含み、且つそれ以外のモノマーユニットが 3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸をモノマーユニットとして含む PHA であることが確認された。また、得られた PHA は、¹H-NMR スペクトル積分比より、3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸のモノマーユニットを 21.9 mol % 含むことがわかった。

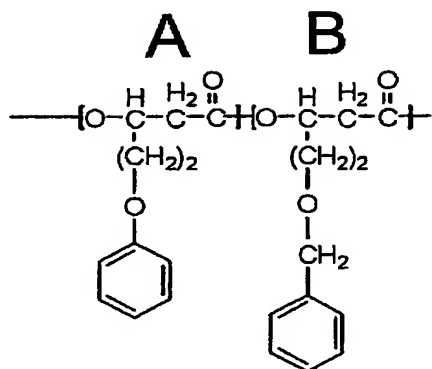
【0147】

【実施例 23】

0.5% のグルコース、6 mM の 5-フェノキシ吉草酸、及び 3 mM の 5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸を前記 M9 培地 100 mL に溶解し、200 mL 容振とうフラスコに入れてオートクレーブにより滅菌した後、室温まで冷却した。調製した培地中に、予め 0.5% のポリペプトンを含む M9 培地で 30℃、8 時間振とう培養したシュードモナス・チコリアイ YN2 株の培養液を 2 mL 加え、30℃、48 時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を回収し、その菌体を再び上記と同じ培地 100 mL に懸濁し、200 mL 容振とうフラスコで 30℃、42 時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を回収し、メタノールで洗浄した後乾燥した。乾燥菌体を秤量後、クロロホルムを加え、35℃で 72 時間攪拌することによりポリマーを抽出した。ポリマーが抽出されたクロロホルムをろ過し、エバポレーターにより濃縮した後、冷メタノールで沈殿固化した部分を集め、減圧乾燥して、目的とするポリマーを得た。実施例 1 と同様の条件で NMR 分析を行った結果を図 2 に示す。得られた PHA は、以下の化学式 (27) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸ユニット) = 63 : 37 : 0) であることが確認された。また、¹³C-NMR (<測定機器> FT-NMR : Bruker DPX 400、共鳴周波数 : ¹³C = 100 MHz、測定核種 : ¹³C、使用溶媒 : CDCl₃、測定温度 : 室温) により測定を行ったところ、B のユニット即ち 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0148】

【化 48】



(27)

ポリマーの分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）により測定した（東ソーHLC-8220GPC、カラム：東ソーTSK-GEL Super HM-H、溶媒：クロロホルム、ポリスチレン換算）。

【0149】

また、得られたポリマーの重量（PDW）は0.17g/l、得られたポリマーの数平均分子量は93,000であった。

【0150】

【実施例24】

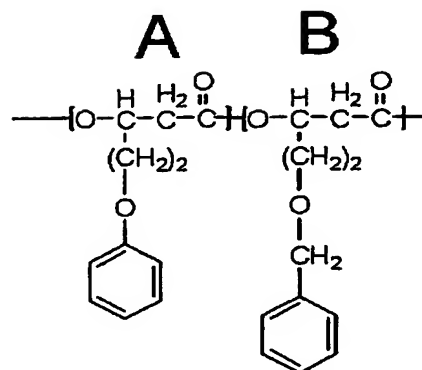
0.5%のグルコース、0.1%のポリペプトン、6mMの5-フェノキシ吉草酸、及び3mMの5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸を前記M9培地100mlに溶解し、200ml容振とうフラスコに入れてオートクレーブにより滅菌した後、室温まで冷却した。調製した培地中に、予め0.5%のポリペプトンを含むM9培地で30℃、8時間振とう培養したシュドモナス・チコリアイYN2株の培養液を2ml加え、30℃、42時間培養した。培養後、遠心分離により菌体を回収し、メタノールで洗浄した後乾燥した。乾燥菌体を秤量後、クロロホルムを加え、35℃で72時間攪拌することによりポリマーを抽出した。ポリマーが抽出されたクロロホルムをろ過し、エバポレーターにより濃縮した後、冷メタノールで沈殿固化した部分を集め、減圧乾燥して、目的とするポリマーを得た。

【0151】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に¹H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(27)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアリカン酸共重合体（A：B：その他（3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカン酸または3-ヒドロキシアリケン酸ユニット）＝38：33：29）であることが確認された。また、実施例23と同様に¹³C-NMR測定を行ったところ、Bのユニット即ち3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0152】

【化 49】



(27)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0153】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.06 g/l、得られたポリマーの数平均分子量は94,000であった。

【0154】

【実施例25】

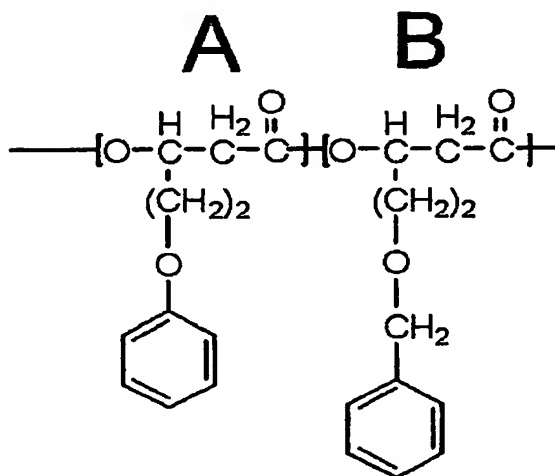
実施例24で用いたYN2株をシュドモナスチコリアイH45株に、実施例24で用いたグルコース及びポリペプトンを0.5%の酵母エキスをに変更した以外は実施例24と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0155】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に¹H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(27)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアリカノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカン酸または3-ヒドロキシアリケン酸ユニット)=42:33:25)であることが確認された。また、実施例23と同様に¹³C-NMR測定を行ったところ、Bのユニット即ち3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0156】

【化50】



(27)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0157】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.05 g/l、得られたポリマーの数平均分子量は91,000であった。

【0158】

【実施例 26】

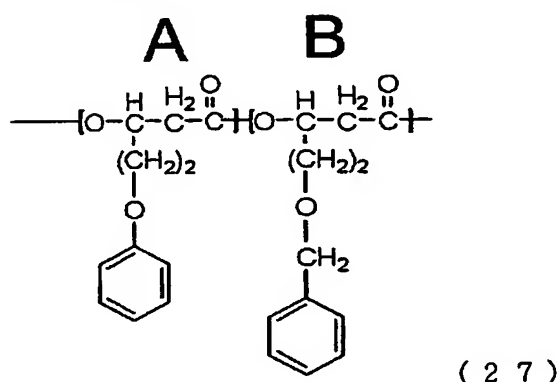
実施例 24 で用いた YN2 株をシュードモナスチコリアイ H45 株に、実施例 24 で用いたグルコース及びポリペプトンを 0.5% のピルビン酸ナトリウムに変更した以外は実施例 24 と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0159】

得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に $^1\text{H-NMR}$ によって行ったところ、以下の化学式 (27) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸ユニット) = 58 : 24 : 18) であることが確認された。また、実施例 23 と同様に $^{13}\text{C-NMR}$ 測定を行ったところ、B のユニット即ち 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0160】

【化 51】



ポリマーの分子量は、実施例 1 と同様に GPC により測定した。

【0161】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.03 g / l、得られたポリマーの数平均分子量は 102,000 であった。

【0162】

【実施例 27】

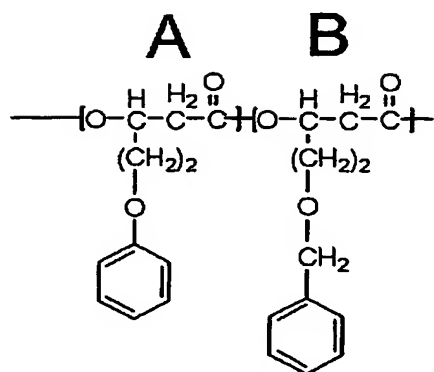
実施例 24 で用いた YN2 株をシュードモナスジェッセニイ P161 株に、グルコース及びポリペプトンを 0.5% グルタミン酸ナトリウムに変更した以外は実施例 24 と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0163】

得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に $^1\text{H-NMR}$ によって行ったところ、以下の化学式 (27) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸ユニット) = 40 : 35 : 25) であることが確認された。また、実施例 23 と同様に $^{13}\text{C-NMR}$ 測定を行ったところ、B のユニット即ち 3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0164】

【化52】



ポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0165】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.08 g/l、得られたポリマーの数平均分子量は89,000であった。

【0166】

【実施例28】

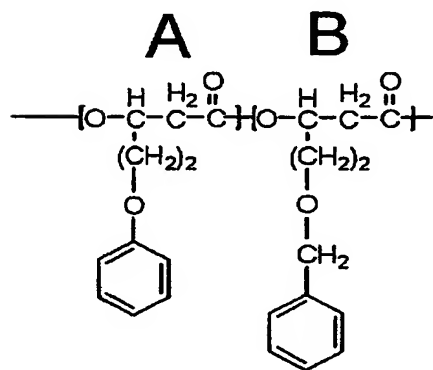
実施例24で用いたYN2株をシュードモナスジェッセニイP161株に、グルコース及びポリペプトンを0.1%のノナン酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で、目的とするポリマーを得た。

【0167】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に¹H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(27)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体(A:B:その他=40:35:25)であることが確認された。また、実施例23と同様に¹³C-NMR測定を行ったところ、Bのユニット即ち3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0168】

【化53】



ポリマーの分子量は、実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0169】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.04 g/l、得られたポリマーの数平均分子量は98,000であった。

【0170】

【実施例29】

実施例24で用いた5-フェノキシ吉草酸を4-フェノキシ酪酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

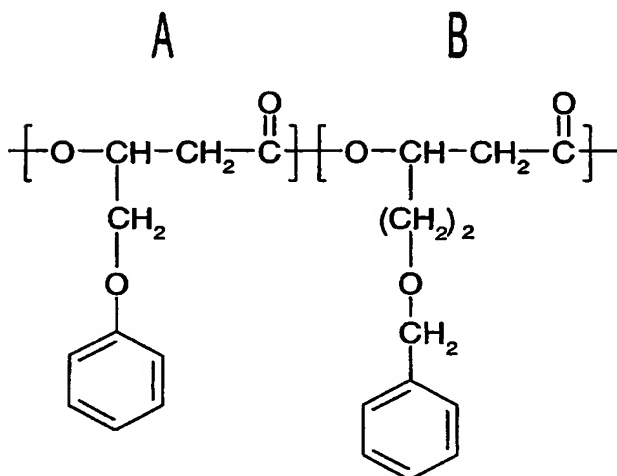
【0171】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に¹H-NMRによって行ったところ

、以下の化学式(28)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸ユニット)=21:43:36)であることが確認された。また、実施例23と同様に ^{13}C -NMR測定を行ったところ、Bのユニット即ち3-ヒドロキシ-5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0172】

【化54】



(28)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。
得られたポリマーの重量(PDW)は0.02 g/l、得られたポリマーの数平均分子量は92,000であった。

【0173】

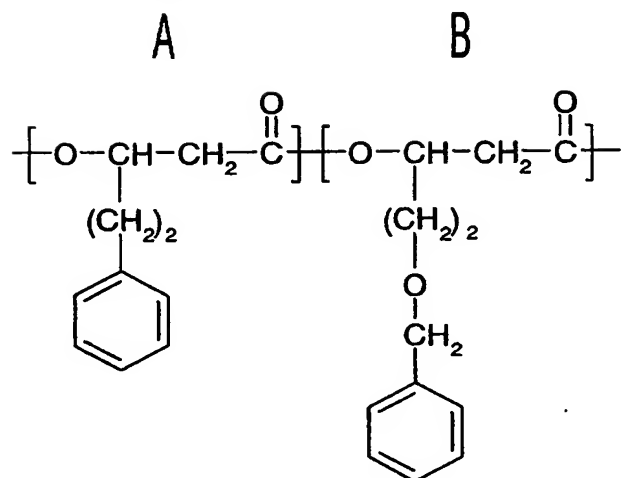
【実施例30】

実施例24で用いた5-フェノキシ吉草酸を5-フェニル吉草酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に ^1H -NMRによって行ったところ、以下の化学式(29)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアルカン酸または3-ヒドロキシアルケン酸ユニット)=56:25:19)であることが確認された。

【0174】

【化55】



(29)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0175】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.13g/l、得られたポリマーの数平均分子量は98,000であった。

【0176】

[実施例31]

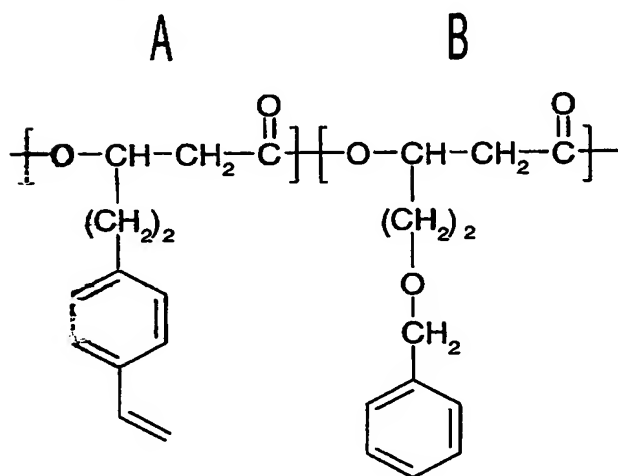
実施例24で用いた5-フェノキシ吉草酸を5-(4-ビニルフェニル)吉草酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0177】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に¹H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(30)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアリカノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカン酸または3-ヒドロキシアリケン酸ユニット)=42:34:24)であることが確認された。

【0178】

【化56】



(30)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0179】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.03g/l、得られたポリマーの数平均分子量は87,000であった。

【0180】

【実施例 3 2】

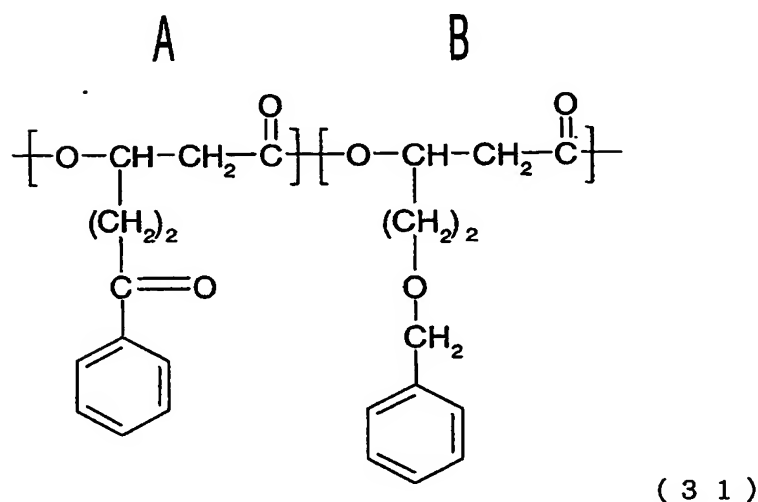
実施例 2 4 で用いた 5-フェノキシ吉草酸を 5-ベンゾイル吉草酸に変更した以外は実施例 2 4 と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0181】

得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に¹H-NMR によって行ったところ、以下の化学式 (31) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸ユニット) = 48 : 27 : 25) であることが確認された。

【0182】

【化 5 7】



ポリマーの分子量は実施例 1 と同様に GPC により測定した。

【0183】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.02 g/l、得られたポリマーの数平均分子量は 160,000 であった。

【0184】

【実施例 3 3】

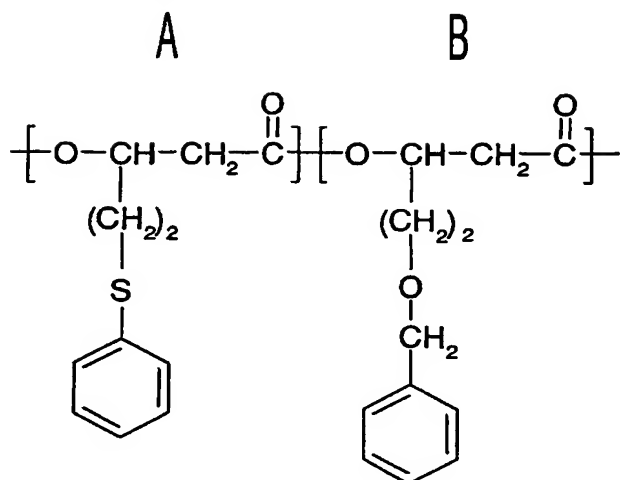
実施例 2 4 で用いた 5-フェノキシ吉草酸を 5-(フェニルスルファニル)吉草酸に変更した以外は実施例 2 4 と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0185】

得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に¹H-NMR によって行ったところ、以下の化学式 (32) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシアルカノエート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸ユニット) = 56 : 22 : 22) であることが確認された。

【0186】

【化58】



(32)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0187】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.11g/l、得られたポリマーの数平均分子量は89,000であった。

【0188】

[実施例34]

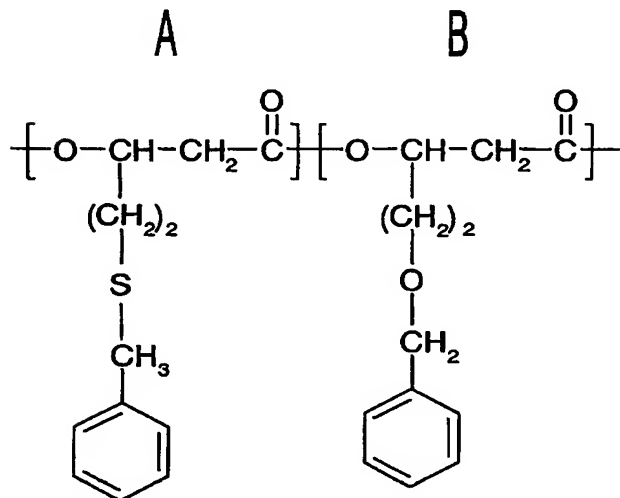
実施例24で用いた5-フェノキシ吉草酸を5-[(フェニルメチル)スルファニル]吉草酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0189】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に¹H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(33)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアリカノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカン酸または3-ヒドロキシアリケン酸ユニット)=46:31:24)であることが確認された。

【0190】

【化59】



(33)

ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0191】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.04g/l、得られたポリマーの数平均分子量は84,000であった。

【0192】

【実施例35】

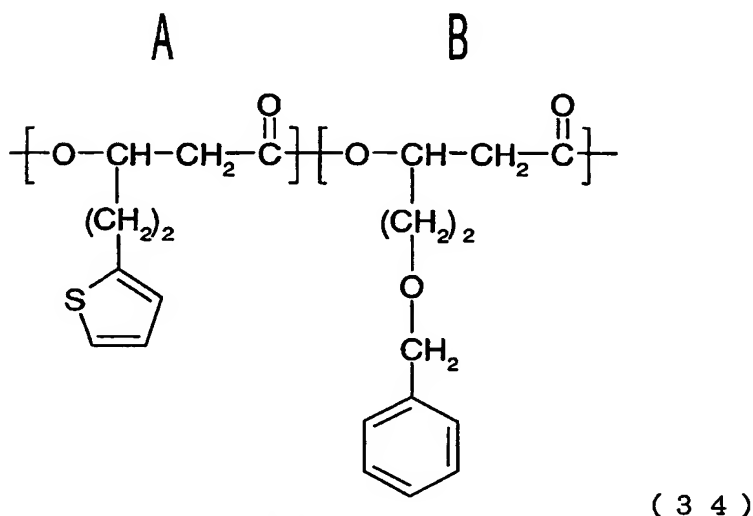
実施例24で用いた5-フェノキシ吉草酸を5-(2-チエニル)吉草酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0193】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に¹H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(34)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアリカノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカン酸または3-ヒドロキシアリケン酸ユニット)=51:26:23)であることが確認された。

【0194】

【化60】



ポリマーの分子量は実施例1と同様にGPCにより測定した。

【0195】

得られたポリマーの重量(PDW)は0.09g/1、得られたポリマーの数平均分子量は86,000であった。

【0196】

【実施例36】

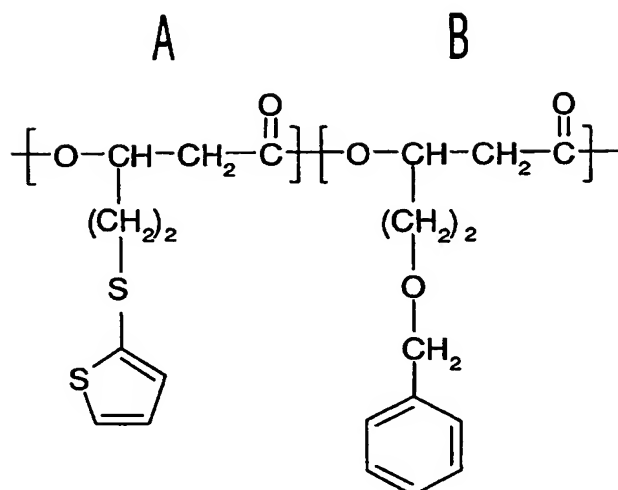
実施例24で用いた5-フェノキシ吉草酸を5-(2-チエニルスルファニル)吉草酸に変更した以外は実施例24と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0197】

得られたポリマーの構造決定を、実施例1と同様に¹H-NMRによって行ったところ、以下の化学式(35)にA及びBで示すユニットを含むポリヒドロキシアリカノエート共重合体(A:B:その他(3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数4から12までの飽和、不飽和脂肪酸である3-ヒドロキシアリカン酸または3-ヒドロキシアリケン酸ユニット)=49:40:11)であることが確認された。

【0198】

【化 6 1】



(3 5)

ポリマーの分子量は実施例 1 と同様に GPC により測定した。

【0199】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.10 g/l、得られたポリマーの数平均分子量は 81,000 であった。

【0200】

[実施例 37]

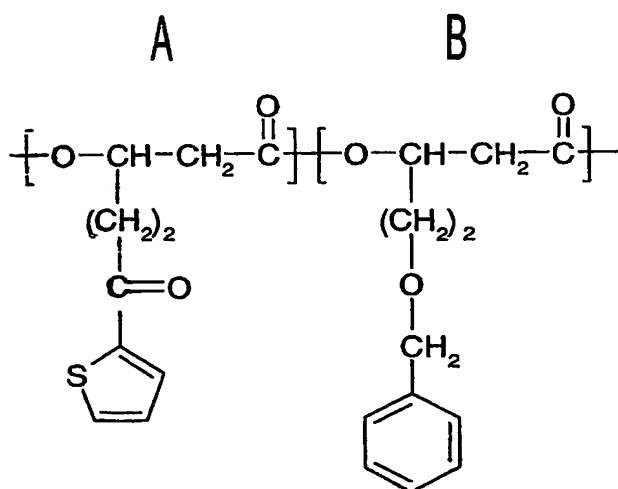
実施例 24 で用いた 5-フェノキシ吉草酸を 5-(2-チエニルカルボニル)吉草酸に変更した以外は実施例 24 と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0201】

得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に $^1\text{H-NMR}$ によって行ったところ、以下の化学式 (36) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシアリカノエート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアリカン酸または 3-ヒドロキシアリケン酸ユニット) = 41 : 40 : 19) であることが確認された。

【0202】

【化 6 2】



(3 6)

ポリマーの分子量は実施例 1 と同様に GPC により測定した。

【0203】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.02 g/l、得られたポリマーの数平均分子

量は 89,000 であった。

【0204】

【実施例 38】

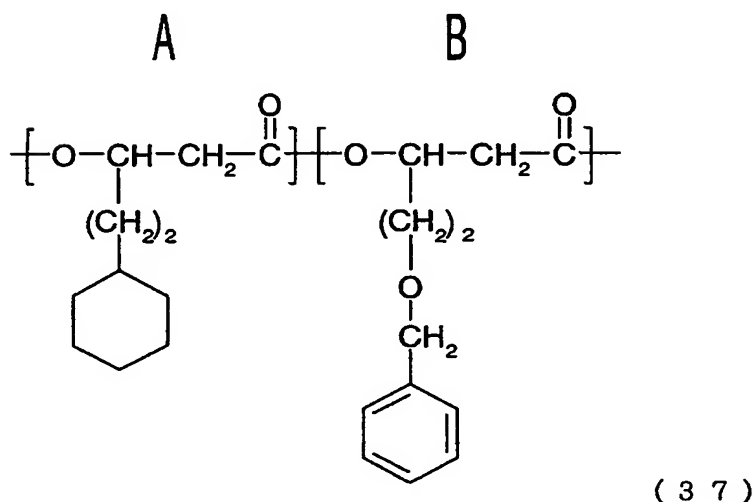
実施例 24 で用いた 5-フェノキシ吉草酸を 5-シクロヘキシル吉草酸に変更した以外は実施例 24 と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0205】

得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に $^1\text{H-NMR}$ によって行ったところ、以下の化学式 (37) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸ユニット) = 46 : 28 : 26) であることが確認された。

【0206】

【化 63】



ポリマーの分子量は実施例 1 と同様に GPC により測定した。

【0207】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.08 g / l、得られたポリマーの数平均分子量は 92,000 であった。

【0208】

【実施例 39】

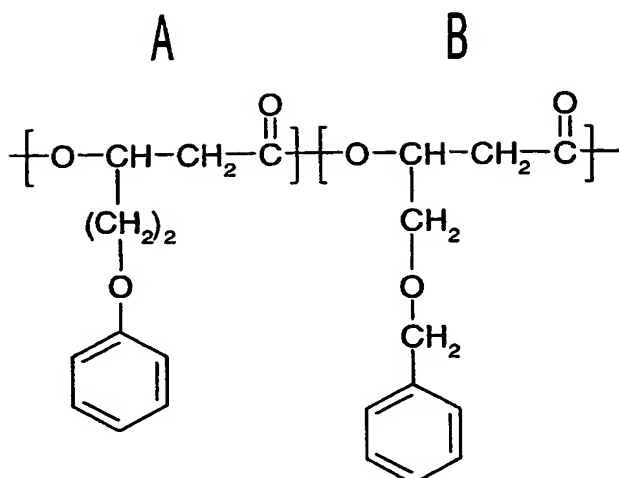
実施例 24 で用いた 5-[(フェニルメチル)オキシ]吉草酸を 4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸に変更した以外は実施例 24 と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【0209】

得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に $^1\text{H-NMR}$ によって行ったところ、以下の化学式 (38) に A 及び B で示すユニットを含むポリヒドロキシアлкаノエート共重合体 (A : B : その他 (3-ヒドロキシ酪酸、3-ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 12 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3-ヒドロキシアルカン酸または 3-ヒドロキシアルケン酸ユニット) = 49 : 24 : 27) であることが確認された。また、実施例 23 と同様に $^{13}\text{C-NMR}$ 測定を行ったところ、B のユニット即ち 3-ヒドロキシ-4-[(フェニルメチル)オキシ]酪酸ユニットが含まれていることが確認された。

【0210】

【化 6 4】



(3 8)

ポリマーの分子量は実施例 1 と同様に G P C により測定した。

【 0 2 1 1】

得られたポリマーの重量 (P D W) は 0. 0 2 g / 1、得られたポリマーの数平均分子量は 9 1, 0 0 0 であった。

【 0 2 1 2】

【実施例 4 0】

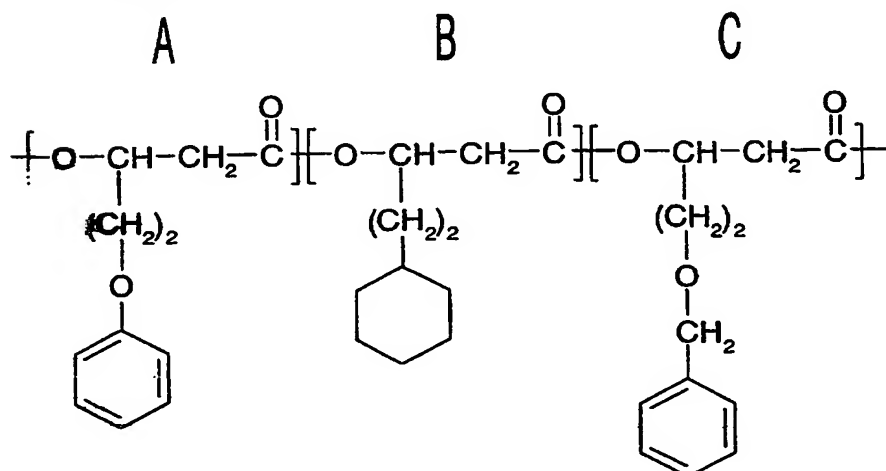
実施例 2 4 で用いた 6 m M の 5 - フェノキシ吉草酸を 3 m M の 5 - フェノキシ吉草酸と 3 m M の 5 - シクロヘキシル吉草酸に変更した以外は実施例 2 4 と同様の方法で目的とするポリマーを得た。

【 0 2 1 3】

得られたポリマーの構造決定を、実施例 1 と同様に $^1\text{H-NMR}$ によって行ったところ、以下の化学式 (3 9) に A ~ C で示すユニットを含むポリヒドロキシアリカノエート共重合体 (A : B : C : その他 (3 - ヒドロキシ酪酸、3 - ヒドロキシ吉草酸などの炭素数 4 から 1 2 までの飽和、不飽和脂肪酸である 3 - ヒドロキシアリカン酸または 3 - ヒドロキシアリケン酸ユニット) = 3 1 : 2 8 : 2 1 : 2 0) であることが確認された。また、実施例 2 3 と同様に $^{13}\text{C-NMR}$ 測定を行ったところ、C のユニット即ち 3 - ヒドロキシ - 5 - [(フェニルメチル) オキシ] 吉草酸ユニットが含まれていることが確認された。

【 0 2 1 4】

【化 6 5】



(3 9)

ポリマーの分子量は実施例 1 と同様に G P C により測定した。

【 0 2 1 5】

得られたポリマーの重量 (PDW) は 0.09 g/l 、得られたポリマーの数平均分子量は 93,000 であった。

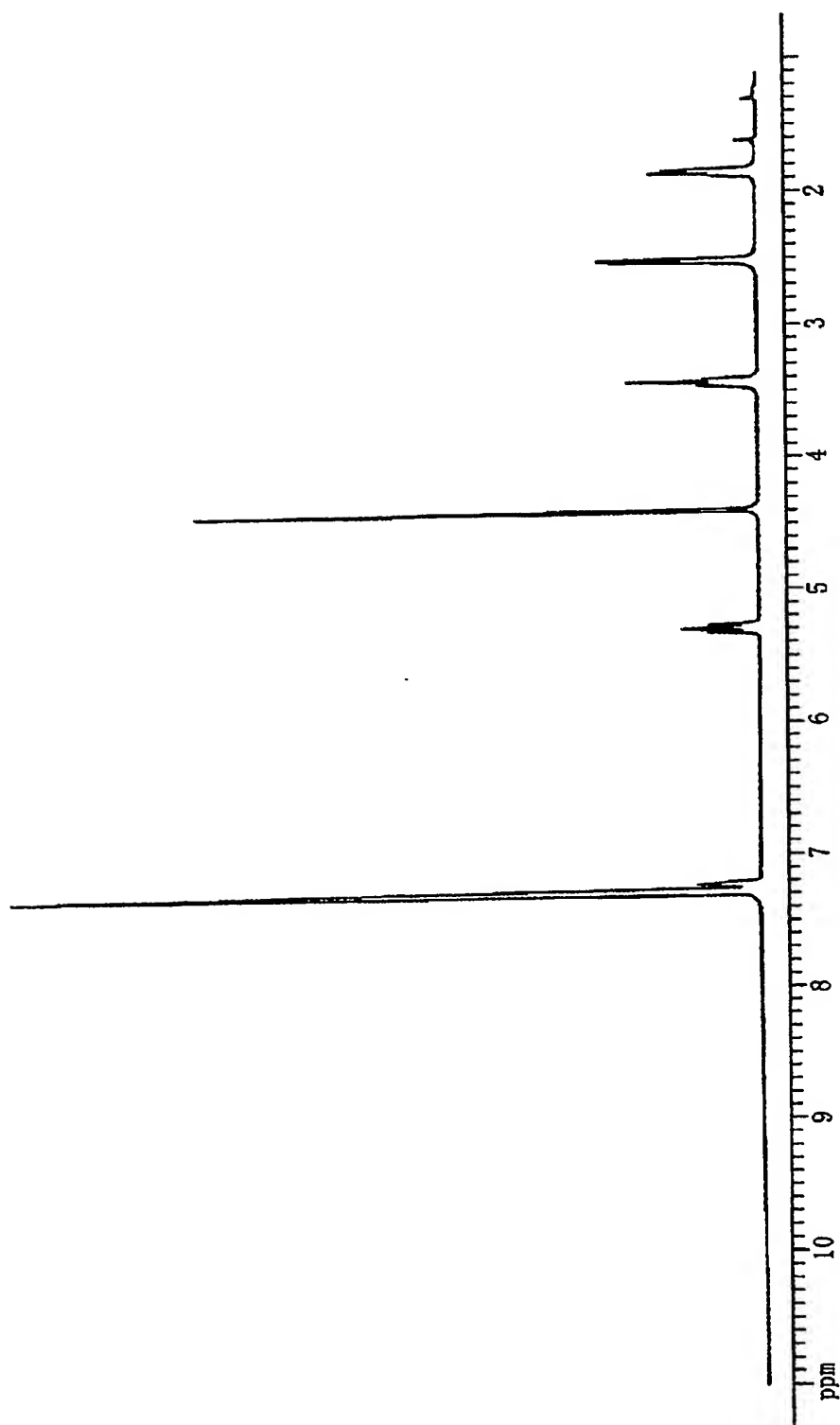
【図面の簡単な説明】

【0216】

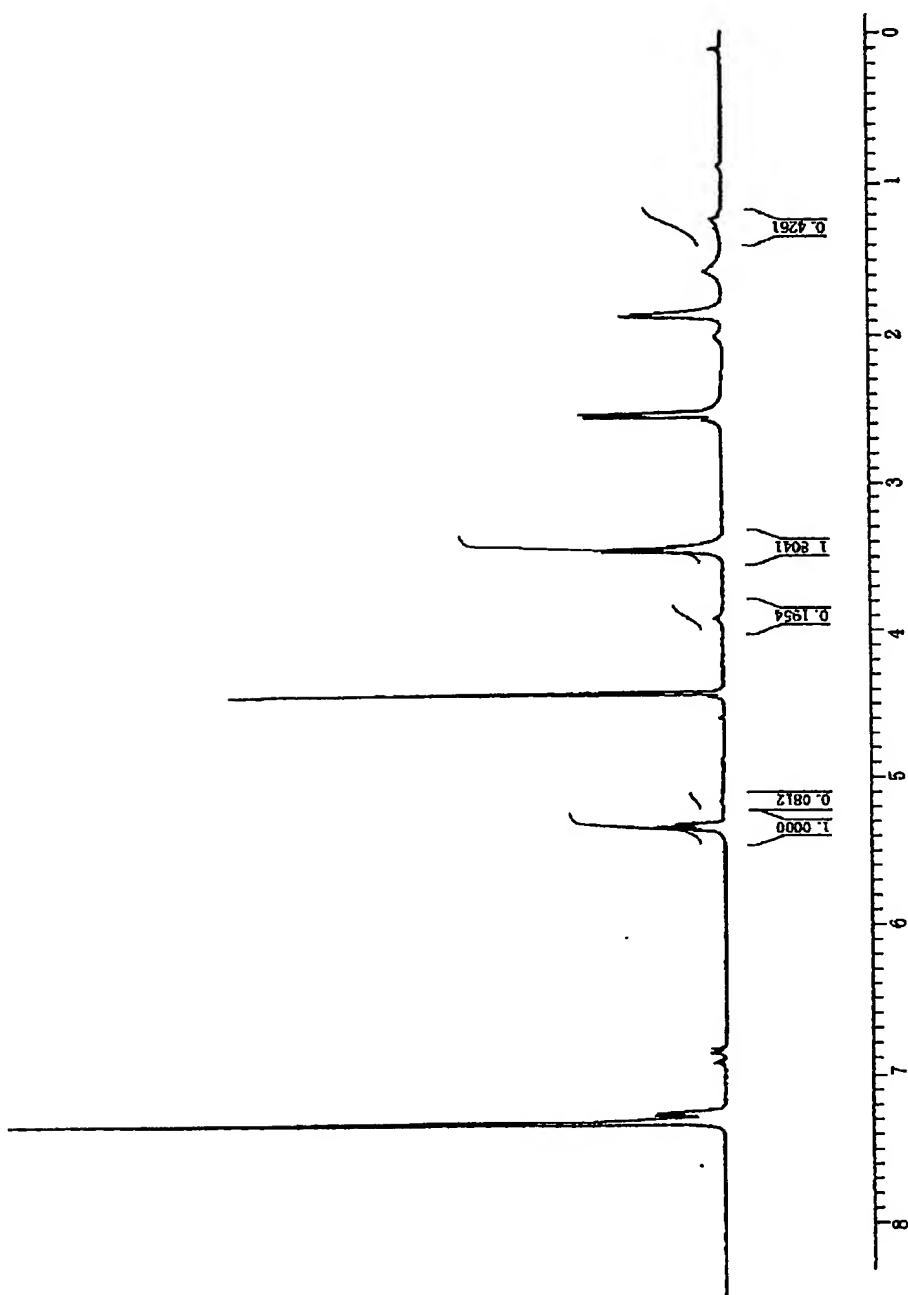
【図1】 実施例1におけるポリヒドロキシアリカノエートの ^1H -NMRスペクトルチャートを示す。

【図2】 実施例23で取得されたポリエステル ^1H -NMRスペクトルチャートを示す。

【書類名】図面
【図1】



【図 2】



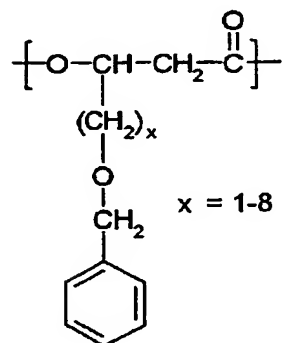
【書類名】要約書

【要約】

【課題】 活性基を有する P H A の微生物による生産性が高く、活性基を有する側鎖のユニット比を制御でき、さらにポリマーとしての応用が制限されないように物性を任意に制御し得るような P H A 及びその製造方法を提供する。

【解決手段】 下記化学式 (1) に示す 3-ヒドロキシ- ω -[(フェニルメチル)オキシ]アルカン酸ユニットを含む P H A 及びその製造方法。

【化 1】



(1)

(x は化学式中に示した範囲内で任意の一つ以上の整数値をとり得る)

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 3 5 6 7 4 9
受付番号	5 0 3 0 1 7 2 1 2 9 2
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0 0 9 5
作成日	平成 1 5 年 1 0 月 2 1 日

< 認定情報・付加情報 >

【特許出願人】

【識別番号】	000001007
【住所又は居所】	東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号
【氏名又は名称】	キャノン株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】	100123788
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都港区赤坂 1 丁目 9 番 2 0 号 第 1 6 興和ビル 8 階 わかば国際特許事務所
----------	--

【氏名又は名称】	宮崎 昭夫
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100088328
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都港区赤坂 1 丁目 9 番 2 0 号 第 1 6 興和ビル 8 階
----------	---------------------------------------

【氏名又は名称】	金田 暢之
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100106297
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都港区赤坂 1 丁目 9 番 2 0 号 第 1 6 興和ビル 8 階 若林国際特許事務所
----------	---

【氏名又は名称】	伊藤 克博
----------	-------

【選任した代理人】

【識別番号】	100106138
--------	-----------

【住所又は居所】	東京都港区赤坂 1 丁目 9 番 2 0 号 第 1 6 興和ビル 8 階
----------	---------------------------------------

【氏名又は名称】	石橋 政幸
----------	-------

特願 2003-356749

出願人履歴情報

識別番号

[000001007]

1. 変更年月日

1990年 8月30日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

氏 名

キヤノン株式会社